

УДК 591.1

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА ВЕРБЛЮДА

**Насибулин Р.Р., Николаев А.А.**

*ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,  
Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru*

В последние десятилетия доказано антитуберкулезное действие лактоферрина верблюжьего молока. Лактоферрин верблюдиц (CLF) является мощным антимикробным железосвязывающим гликопротеином, обнаруживаемым в молозиве и других экзокринных выделениях млекопитающих. Но в мировой литературе мало сведений о способах выделения лактоферрина из молока верблюдов. Изучена термостабильность лактоферрина верблюда, его седиментационные свойства и взаимодействие с рядом лектинов. Разработан новый способ выделения лактоферрина молока верблюдов, основанный на характерных для лактоферрина молока верблюдов высокой термостабильности и аффинности к лектину бодяги речной. Способ прост в исполнении и позволяет получить высокоочищенный препарат лактоферрина молока верблюда с высоким выходом целевого продукта. Анализ полученных результатов показал, что аффинная хроматография на лектине бодяги речной не только значительно упростила и сократила время выделения и очистки лактоферрина верблюдиц, но и достоверно повысила выход целевого продукта с 38,5% до 49,3%. Также возросла степень чистоты препарата с 92,1% до 98,3%. Объективно эти цифры подтверждают электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 4). На препарате видно наличие белковых примесей в лактоферрине, полученном гепарин-сефарозной хроматографией.

**Ключевые слова:** лактоферрин, верблюд, туберкулез, хроматография, лектины

## DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ISOLATION OF CAMEL LACTOFERRIN

**Nasibulin R.R., Nikolaev A.A.**

*Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru*

In recent decades, the anti-tuberculosis effect of camel milk lactoferrin has been proven. Camel lactoferrin (CLF) is a powerful antimicrobial iron-binding glycoprotein found in colostrum and other exocrine secretions of mammals. The thermal stability of camel lactoferrin, its sedimentation properties and interaction with a number of lectins have been studied. A new method of isolation of lactoferrin in camel milk has been developed, based on the property of high thermal stability and affinity to lectin of the river waterworm, characteristic of camel milk lactoferrin. The method is simple in implementation and allows you to obtain a highly purified preparation of camel milk lactoferrin with a high yield of the target product. The analysis of the results obtained showed that affinity chromatography on river waterfoot lectin not only significantly simplified and reduced the isolation and purification time of camel lactoferrin, but also significantly increased the yield of the target product from 38.5% to 49.3%. The degree of purity of the preparation also increased from 92.1% to 98.3%. Objectively, these figures are confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 4). The preparation shows the presence of protein impurities in lactoferrin obtained by heparin-sepharose chromatography.

**Keywords:** lactoferrin, camel, tuberculosis, chromatography, lectins

В настоящее время широкое распространение лекарственно-устойчивого туберкулеза приняло опасные тенденции. Это вызвало необходимость поиска фармакологических средств, основанных на действии на жизненно важные участки метаболизма микобактерий [1, 2]. Антибиотики и химиотерапевтические средства вызывают слишком быструю адаптацию микобактерий и в настоящее время акценты исследований перемещаются в область биологически активных дериватов природных антибактериальных средств растительного и животного происхождения. Широко известна целебная сила верблюжьего молока для больных туберкулезом. В последние десятилетия доказано антитуберкулезное действие лактоферрина верблюжьего молока [3]. Но в мировой литературе нет сведений о способах выделения биоактивных пептидов из молока

верблюдов. Лактоферрин верблюдиц (CLF) является мощным антимикробным железосвязывающим гликопротеином, обнаруживаемым в молозиве [4] и других экзокринных выделениях млекопитающих [5, 6]. Структурно CLF представляет собой мономер 80 кДа, который содержит две равные моноферрические доли – N-лепесток и C-лепесток [7]. Обе доли связаны друг с другом короткой 3D-спиралью. Каждый лепесток содержит два равных домена, названных N1 и N2 в N-лепестке и C1 и C2 в C-лепестке [8].

Известно, что CLF проявляют широкий спектр антимикробной активности против разнообразных бактерий, вирусов и грибов *in vitro* [6]. Наблюдалось, что CLF оказывает свое антимикробное действие посредством секвестрации железа в качестве нативной молекулы. Тем не менее поскольку LF под-

вергается воздействию различных протеаз в кишечнике и впоследствии расщепляется на различные функциональные фрагменты, было бы целесообразно изучить антимикробный эффект, а также свойства высвобождения железа этими гидролизованнами молекулами.

Антимикробные пептиды лактоферрина предотвращают микробное заражение и уничтожают бактериальный агент и управляют врожденной иммунной модуляцией [9, 10]. Прямое антимикробное уничтожение достигается разрушением бактериальных клеточных мембран, или транслокации в бактерии, чтобы влиять на внутренние цели. Катионные амфифильные пептиды связываются с отрицательно заряженными фосфолипидами бактериальных клеточных мембран [6]. Предполагается, что формирование поры приводит к разрушению мембраны. Недавно получены доказательства, что молекулы пептидов лактоферрина действуют на поверхности клеток и вызывают прямое уничтожение бактерий. Известно, что лактоферрины различных видов (корова, коза, верблюдица) отличаются по своей активности в отношении различных бактериальных агентов. Однако наиболее активно изучаются пептиды лактоферрина коровьего молока. Исследованию лактоферрина молока верблюдицы уделяется мало внимания. Однако в Астраханской области это широко распространённый и доступный продукт, который может послужить доступным, дешёвым сырьём для производства нового класса антибактериальных препаратов.

Цель исследования – разработка современного эффективного способа выделения лактоферрина верблюда (CLF) на основе исследования его физико-химических свойств.

#### **Материалы и методы исследования**

Объектом нашего исследования на данном этапе было молоко верблюдиц с оптимальной концентрацией лактоферрина (7–28 дни лактации). В работе использовано 93 образца молока верблюдиц, которые получали с верблюдоводческих ферм Красноярского и Харабалинского районов Астраханской области в октябре – ноябре 2018 г. Материал исследования (молоко верблюдиц) обрабатывался поэтапно. На первом этапе образцы молока центрифугировали при 8000 об/мин в течение 40–45 мин и затем удаляли образовавшуюся жировую (масляную) фракцию. Безжировую сыворотку маркировали, определяли концентрацию лактоферрина и хранили при  $-18^{\circ}\text{C}$ .

На втором этапе аликвоты молочных сывороток с наибольшей концентрацией лактоферрина объединяли и использовали для дальнейшего выделения целевого продукта. Для выяснения физико-химических свойств CLF, необходимых для его выделения и очистки, использованы, методы электрофореза, гель-фильтрации, иммуноэлектрофореза и иммунодиффузионного анализа в агаре (ИДА) [11].

Полученные результаты исследований обработаны с помощью пакета статистического анализа Statistica 6, SPSS V 10.0.5, программ «STATLAND», «EXCEL-97», «Basic Statistic» с учетом стандартных методик вариационной статистики, включая вычисление критерия t Стьюдента для оценки достоверности различий. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , достоверные различия обсуждались при  $t < 0,01$ .

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Определение термолабильности CLF. Исследование термолабильности проводили путем прогрева аликвот (0,4 мл) сыворотки молока верблюдиц в термостатируемой водяной бане от  $40^{\circ}\text{C}$  до  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин при каждой температуре. Определение CLF проводили методом радиальной иммунодиффузии. Определение общего белка спектрофотометрически. Всего исследовано 23 образца сыворотки молока верблюдиц. Результаты исследования представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, CLF сохраняет свои антигенные свойства практически полностью при температуре  $75^{\circ}\text{C}$ , при этом его относительная концентрация (степень очистки) возрастает в 6,2 раза из-за денатурации балластных белков.

Определение преципитационных характеристик CLF. Эффективным методом выделения белков считается градиентное высаливание. Мы использовали высаливание сульфатом аммония. Сыворотка молока верблюдиц, была забуферена трис-солянокислым буфером в ячейке для ультрафильтрации Stirred Ultrafiltration Cells Models 8010. Осаждение CLF проводили насыщенным раствором сульфата аммония. Конечная концентрация сульфата аммония выражалась в его молярной концентрации. Показано, что преципитация сульфатом аммония не имеет самостоятельного значения для очистки CLF, так как максимальная степень очистки преципитацией при концентрации 2,0 М сульфата аммония менее 2,0. Тем не менее в общей схеме очистки преципитация сульфатом аммония может быть использована в сочетании с другими методами.

Таблица 1

Определение термолабильности CLF

Контрольная температура в град °С	Число образцов	Проценты общего белка от исходного	Проценты CLF от исходного	Отношение CLF /ОБ в процентах
40	4	98	100	0,06
45	6	76	100	1,7
50	5	62	100	2,4
55	4	54	100	3,1
60	7	43	100	3,9
65	6	37	89	4,4
70	7	24	87	5,7
75	6	17	84	6,2
80	7	12	71	7,4

Взаимодействие CLF с лектинами. Широко известно [12] эффективное использование углеводовсвязывающих белков – лектинов, для очистки самых различных протеинов. Лектины используют в качестве лигандов в аффинной хроматографии, что значительно упрощает и ускоряет процесс очистки многих минорных белков биологических жидкостей и тканей человеческого организма. Мы провели эксперимент по связыванию препарата CLF, полученного ранее хроматографическими методами, с различными лектинами. Проверка связывания проводилась методом ракетного иммуноэлектрофореза после предварительной инкубации препарата CLF с иммобилизованными лектинами чечевицы, конканвалином А, лектином арахиса, лектином бодяги речной (*Ephydatia fluviatilis*) и лектином икры окуня.

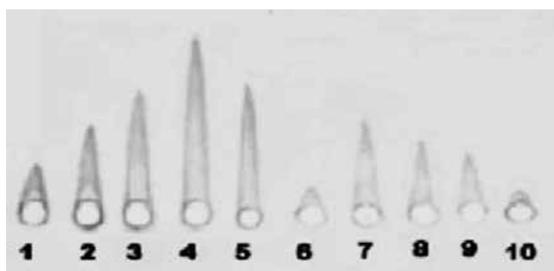


Рис. 1. Ракетный иммуноэлектрофорез препарата CLF после обработки различными лектинами.  
1–4 – Разведения CLF. Концентрации 5, 10, 15, 20 мкг/мл, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – образцы CLF после взаимодействия с иммобилизованными лектинами: 5 – лектин арахиса; 6 и 10 – лектин бодяги речной (*Ephydatia fluviatilis*); 7 – лектин чечевицы; 8 – лектин икры окуня; 9 – конканвалин А

Учитывая углеводную специфичность использованных лектинов [12], в CLF мало

доступны группы глюкозы и галактозы. Отмечается умеренное родство к фукозе. Наиболее эффективно связывается CLF с лектином бодяги речной (*Ephydatia fluviatilis*) и достаточно значимо с конканвалином А. Это свидетельствует о преобладании в углеводном компоненте CLF галактозамина и метилманнозы.

Для выделения CLF мы предлагаем провести аффинную хроматографию полученной после тепловой обработки сыворотки молока верблюдиц на иммобилизованном лектине бодяги речной. Выбор лектина бодяги речной обусловлен практически полным связыванием CLF с этим лектином (по нашим данным 92–93%), кроме того, этот лектин мало изучен, так как описан относительно недавно [13]. Иммобилизацию лектина мы провели на агарозном геле, активированном трихлортриазинном.

100 мл геля агарозы 4В промыли на воронке деионизированной водой, затем суспендировали в 100 мл ацетона и перемешали 30–45 мин при комнатной температуре. Растворили 0,5–1 г TsT в 15–20 мл ацетона, затем добавили такое же количество воды. Эту и все последующие операции проводили под тягой из-за токсичности TsT. Приливая раствор триазина с перемешиванием к суспензии геля, добавляли 10 мл 2 М NaHCO<sub>3</sub>, перемешивали ещё 5 мин, быстро отфильтровали и промывали гель 0,1 М фосфатным буфером (рН 6,7) в 50%-ном ацетоне. Затем уравнивали гель в 0,5 М боратном буфере (рН 8,7) и добавили лектин клещевины из расчета 3–5 мг на 1 мл геля. Суспензию перемешивали 10–12 ч при +4 °С. Далее промывали тем же буфером от избытка лиганда и обрабатывали 5% раствором этаноламина для блокирования незамещенных активных центров. Гель хранили до использования в 0,5 М боратном буфере, рН 8,0, содержащем 0,005% азид натрия при +4 °С.

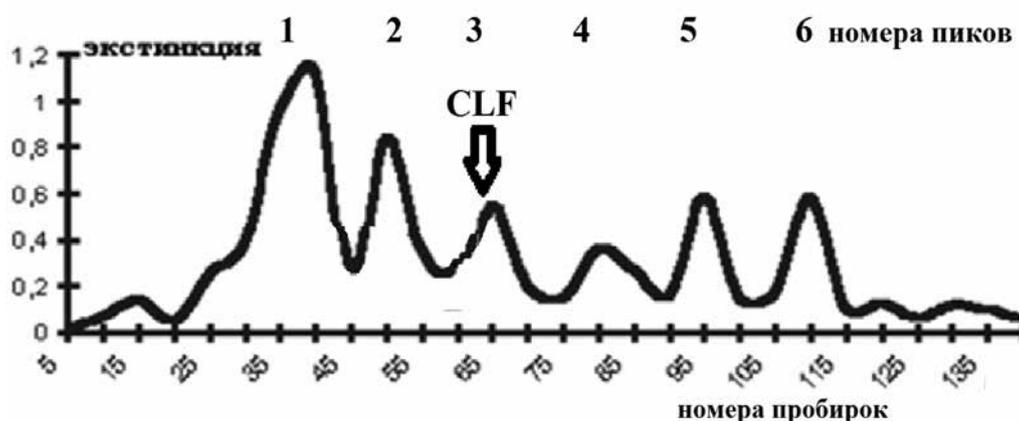


Рис. 2. Гель-фильтрация белков сыворотки молока верблюдицы на колонке сефадекса G-200. (Колонка 1,2x95 см, фракции по 2,0 мл). Стрелками указана зона выхода CLF по данным иммунохимического анализа

Гель-фильтрация CLF. Гель-фильтрация широко распространена как метод выделения, очистки и характеристики белковых молекул. Мы провели гель-хроматографию белков сыворотки молока верблюдицы. Железосодержащий белок CLF выходит в проксимальной части третьего хроматографического пика и иммунохимически идентифицируется с 65 по 78 пробирки (рис. 2). Пробирки, содержащие CLF, сливали и в этой фракции определяли общее содержание белка и общее содержание CLF для расчета степени очистки и выхода белка. На основании расчета свободного объема колонки к выходу CLF рассчитана его молекулярная масса, равная  $81,0 \pm 5,2$  KD.

Таким образом, в процессе гель-фильтрации удаётся однократно повысить степень очистки CLF более чем в 6 раз, но недостатком этого метода мы считаем большие потери выделяемого белка, которые составляют более 50%.

Известен способ выделения верблюжьего лактоферрина, основанный на связывании анионных соединений, таких как гепарин и ДНК, эти материалы были использованы для очистки лактоферрина [14]. Выделение CLF проводилось элюированием градиентом 1,0 М хлорида натрия в 10 мМ фосфатном буфере из колонки гепарин-сефарозы.

Мы провели сравнительное исследование выделения и очистки лактоферрина верблюдиц известным способом и способом, разработанным нами на основе обнаружения способности лектина бодяги речной эффективно связывать лактоферрин верблюдиц.

Очистка CLF способом, основанным на гепарин-сефарозной хроматографии. Для очистки лактоферрина верблюдиц использовали 450 мл безжировой фракции молока верблюдиц.

На первой стадии проводили диализ безжировой фракции молока верблюдиц против 0,5 мМ веронал-солянокислого буфера с pH = 7,4. Диализ проводили при температуре +4 °С, при постоянном перемешивании; продолжительность диализа 28–36 ч, при четырехкратной смене буфера.

На следующей стадии проводили гепарин-сефарозную хроматографию на стандартной колонке heparin sepharose CL-6B 10 ML, GE Healthcare (приобретена в компании Пущинские лаборатории). Хроматографию проводили в веронал-солянокислом буфере pH = 7,4. Сначала через колонку пропускали 90 мл безжировой отдиализованной фракции молока верблюдиц, а затем проводили хроматографию с линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 1,0 М. скорость потока составляла 50 мл в час. Пик элюции верблюжьего лактоферрина приходился на концентрацию хлорида натрия 0,5 М. Содержание CLF во фракциях определяли иммунохимически. Пробирки, содержащие CLF, сливали и определяли общую концентрацию CLF (рис. 3).

Недостатками этого метода являются: трудоемкость, длительность проведения, невысокий выход продукта и недостаточная его чистота. Этот метод не позволяет накопить достаточные количества чистого препарата лактоферрина верблюдиц, так как колонка heparin sepharose CL-6B 10 ML, GE Healthcare не позволяет по своей ём-

кости пропускать более 90 мл безжировой фракции молока верблюдиц. При элюции объемов, превышающих 90 мл по нашим данным, часть лактоферрина верблюдиц не связывается с гепарином и выходит из колонки в нулевом объеме.

Мы провели исследование по упрощению и ускорению способа очистки CLF. Нами предложен новый способ очистки лактоферрина верблюдиц, основанный на обнаруженной нами способности лектина бодяги речной связывать лактоферрин верблюдиц.

Очистка CLF способом, основанным на аффинной хроматографии с лектином бодяги речной.

Для очистки лактоферрина верблюдиц использовали 450 мл безжировой фракции молока верблюдиц (получение описано в разделе «Материалы и методы исследования»).

На первой стадии проводили термическую обработку всего используемого объема безжировой фракции молока верблюдиц при 75 °С в течение 30 минут в термостатируемой ячейке автотермостата АМ-208. Далее полученная фракция подвергалась центрифугированию при 8000 об/мин в течение 40 мин на центрифуге ЦЛС-32. Надосадочная жидкость собиралась и использовалась в дальнейшей работе.

Заключительная стадия очистки CLF представляет собой аффинную хромато-

графию лактоферрина верблюдиц на иммобилизованном лектине бодяги речной. Через колонку (1,5x12 см) лектин-сефарозы, уравновешенную трис-НСl буфером, пропускали весь объем полученной на предшествующей стадии, фракции. Далее колонку промывали 1 М раствором хлорида натрия, забуференного трис-НСl буфером, а затем элюировали, связанный на колонке CLF 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН = 9,0. Полученный элюат диализовали и концентрировали до приемлемого объема (26,0 мл).

В табл. 2 приведены сведения сравнительного исследования выделения лактоферрина верблюдиц методом гепарин-сефарозной хроматографии (1 способ) и аффинной хроматографии с лектином бодяги речной (2 способ). Анализ полученных результатов показал, что аффинная хроматография на лектине бодяги речной не только значительно упростила и сократила время выделения и очистки лактоферрина верблюдиц, но и достоверно повысила выход целевого продукта с 38,5% до 49,3%. Также возросла степень чистоты препарата с 92,1% до 98,3%. Объективно эти цифры подтверждает электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 4). На препарате видно наличие белковых примесей в лактоферрине, полученном гепарин-сефарозной хроматографией.

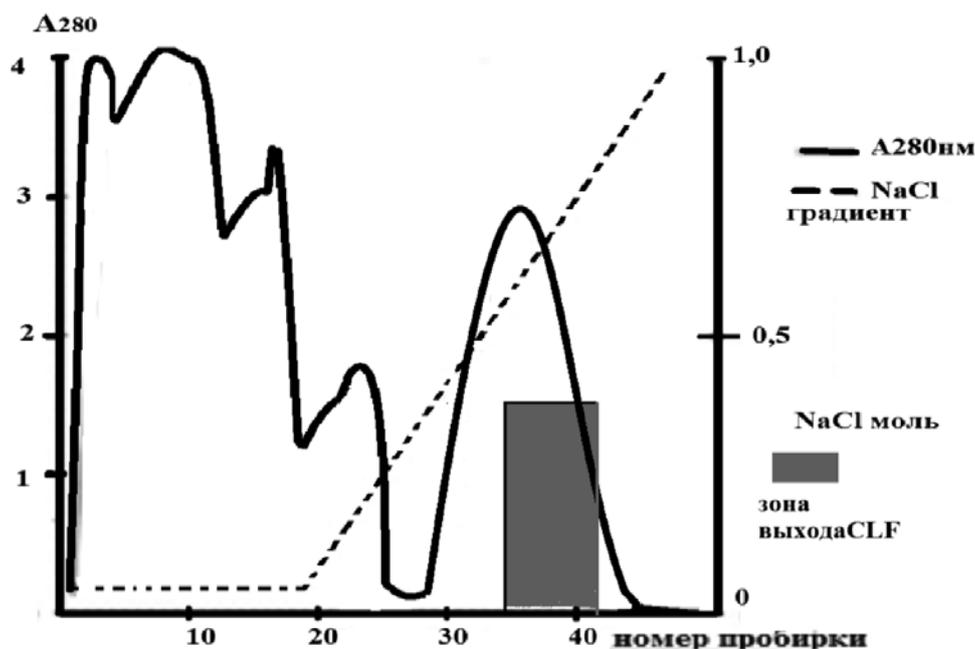


Рис. 3. Гепарин-сефарозная хроматография безжировой фракции молока верблюдиц

Таблица 2

Сравнительный анализ способов выделения лактоферрина верблюдиц

Стадии очистки	1 способ			2 способ		
	Общий белок (мг)	CLF мг	Выход CLF%	Общий белок (мг)	CLF мг	Выход CLF%
Исходный сливной препарат молока	32205,75	1280,6	100	32451,0	1267,9	100
безжировая фракция молока верблюдиц	30716,00	1232,5	96,24	31021,00	1229,0	96,93
диализ безжировой фракции молока верблюдиц	27272,05	1098,0	85,74	–	–	–
гепарин-сефарозная хроматография	518,65	493,0	38,5	–	–	–
Термическая обработка	–	–	–	15076,2	1123,4	88,6
Аффинная хроматография на лектине бодяги речной	–	–	–	637,86	626,3	49,3
Степень очистки	26,43			38,6		
Чистота препарата	92,1			98,3		

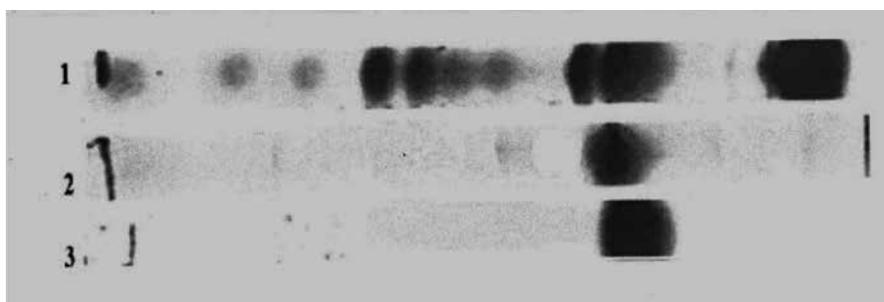


Рис. 4. Электрофорез в полиакриламидном геле. 1 – исходная безжировая фракция молока верблюдиц; 2 – лактоферрин верблюдиц, полученный гепарин-сефарозной хроматографией; 3 – лактоферрин верблюдиц, полученный аффинной хроматографией на лектине бодяги речной

Таким образом, разработан новый способ выделения лактоферрина молока верблюдов, основанный на характерных для лактоферрина молока верблюдов свойствах высокой термостабильности и аффинности к лектину бодяги речной. Способ прост в исполнении и позволяет получить высокоочищенный препарат лактоферрина молока верблюда с высоким выходом целевого продукта.

#### Список литературы

- Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H.S., Zignol M., Soolingel D., Jensen P., Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*. 2010. Vol. 375. P. 1830–1843.
- Franzblau S.G., DeGroot M.A., Cho S.H., Andries K., Nuermberger E., Orme I.M., Mdluli K. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2012. Vol. 92. P. 453–488.
- Gupta A., Bhakta S. An integrated surrogate model for screening of drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2012. Vol. 67. P. 1380–1391.
- Oda H., Kolawole A.O., Mirabelli C., Wakabayashi H., Tanaka M., Yamauchi K., Abe F., Wobus C.E. Antiviral effects of bovine lactoferrin on human norovirus. *Biochem Cell Biol*. 2021. Vol. 99. No. 1. P. 66–172. DOI: 10.1139/bcb-2020-0035.
- Wang B., Timilsena Y.P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019. Vol. 54. No. 4. P. 580–596. DOI: 10.1080/10408398.2017.1381583.
- Almehdar H.A., El-Baky N.A., Alhaider A.A., Almuhaideb S.A., Redwan E.M. Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Camel Lactoferrins Against *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2020. Vol. 12. P. 18–23. DOI: 10.1007/s12602-019-9520-5.
- Zhang J., Lai S., Cai Z., Chen Q., Huang B., Ren Y. Determination of camel lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standards. *Anal. Chim. Acta*. 2014. Vol. 829. P. 33–39.
- Bokkhim H., Bansal N., Grondahl L., Bhandari B. Physico-chemical properties of different forms of camel lactoferrin. *Food Chem*. 2013. Vol. 141. P. 3007–3013.
- Konuspayeva G.B., Faye G., Loiseau S., Levieux D. Lactoferrin and Immunoglobulin Contents in Camel's Milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* and Hybrids) from Kazakhstan. *J. Dairy Sci.* 2017. Vol. 98. P. 38–46.
- Ibrahim H.M., Mohammed-Geba K., Tawfic A.A., El-Magd M.A. Camel milk exosomes modulate cyclophosphamide-induced oxidative stress and immuno-toxicity in rats. *Food Funct*. 2019. Vol. 10. No. 11. P. 7523–7532. DOI: 10.1039/c9fo01914f.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 2006
- Луцик М.Д., Лектины. Киев: «Наукова думка», 1993. 196 с.
- Николаев А.А. Характеристика лектина из бодяги речной (*Ephedaria fluviatilis*) // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 2–1. С. 24–27.
- Al-Mashikhi S., Nakai S. Isolation of Bovine Immunoglobulins and Lactoferrin from Whey Proteins by Gel Filtration Techniques. *J. Dairy Sci.* 2007. Vol. 70. P. 2486–2492.