

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСОВ ЛАКТОФЕРРИНА И ФУКОИДАНА В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ *IN VITRO*

*Д.В. Мосиевич^{1,2}, Н.Г. Балабушевич², П.И. Мишин², И.М. Ле-Дейген², Л.Ю. Филатова²,
О.М. Панасенко¹, М.А. Мурина¹, Т.В. Вахрушева¹, Н.А. Баринов¹, О.В. Побегун¹, М.А. Галямина¹,
И.В. Горудко³, Д.В. Григорьева³, К.Ф. Пашкевич³, А.В. Соколов^{1,4}, Е.В. Михальчик^{1*}*

¹Научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; *эл. почта: lemik2007@yandex.ru

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

³Белорусский государственный университет, 220030, Беларусь, Минск, пр. Независимости, 4

⁴Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17

Фукоидан — анионный полисахарид из бурых водорослей, проявляющий антикоагулянтную, антиокислительную, противовоспалительную, противоопухолевую и противовирусную активность — способен образовывать полиэлектролитные комплексы с различными белками, включая терапевтически важный лактоферрин. Целью данного исследования было изучение физико-химических и функциональных особенностей комплекса фукоидана и лактоферрина, образующегося при смешивании их растворов при физиологических значениях pH. Комплекс, регистрируемый с помощью атомно-силовой микроскопии, имел отрицательный заряд и гидродинамический диаметр 382 нм. Взаимодействие с лактоферрином приводило к изменениям в области ИК-спектра фукоидана в полосе поглощения в диапазоне 1220–1260 см⁻¹, соответствующем колебаниям сульфатной группы, увеличивало суммарную антиокислительную активность биополимеров в реакции Фентона и снижало антикоагулянтную активность фукоидана, оцениваемую по данным определения активированного частичного тромбопластинового времени. Фукоидан снижал активность люциферазы в модельной системе люциферин-люцифераза, а образование комплекса с лактоферрином ослабляло ингибирующую способность фукоидана. Полученные результаты свидетельствуют о возможности направленно влиять на функциональную активность биополимеров при включении их в комплекс и о перспективности использования фукоидана и лактоферрина в виде комплекса при разработке новых препаратов и средств доставки лекарств.

Ключевые слова: лактоферрин; фукоидан; полиэлектролитные комплексы; антиокислительная активность; антикоагулянты; люциферин-люцифераза

DOI: 10.18097/PBMC1613

ВВЕДЕНИЕ

Образование полиэлектролитных комплексов белков с полисахаридами рассматривают как перспективный путь к повышению устойчивости белков в водных средах [1] и к получению нано- и микроразмерных контейнеров для доставки лекарств [2, 3]. В результате межмолекулярных взаимодействий происходит изменение физико-химических свойств биополимеров, что может влиять на их функциональную активность [4, 5].

Фукоидан представляет собой анионный полисахарид из бурых водорослей, состоящий преимущественно из остатков сульфатированной фукопиранозы с 1→3 и 1→4 связями, с включением галактозы, маннозы, ксилозы, глюкуроновой кислоты. Фукоидан хорошо растворим в воде, нетоксичен и обладает высокой биосовместимостью. Растворы фукоидана обладают низкой вязкостью. Благодаря подтвержденной многочисленными исследованиями противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой, антиокислительной, антикоагулянтной активности фукоидан может

служить не только структурным компонентом средств доставки [6], но и оказывать терапевтическое действие [7]. Антиокислительную активность фукоидана нередко связывают с трудно отделяемыми при очистке полифенолами, присутствующими в его препаратах [8, 9].

При разработке новых подходов к терапии воспалительных заболеваний кишечника особое внимание привлекает не только фукоидан [7], но и лактоферрин [10] — катионный гликопротеин (pI 8,0–9,0), склонный к агрегации в водных растворах и чувствительный к изменению pH среды. Комплексы с фукоиданом позволяют сохранить пространственную структуру лактоферрина и улучшить его стабильность и биодоступность [11, 12].

При разработке медицинских препаратов и средств их доставки важно понимать преимущества использования комплексов биополимеров. В настоящей работе мы поставили цель изучить физико-химические и функциональные особенности комплекса фукоидана и лактоферрина (Ф-Л) при физиологических значениях pH. Для этого исследовали антиокислительную активность этих



биополимеров в реакции Фентона, антикоагулянтное действие фукоидана и его способность ингибировать активность фермента люциферазы.

Для анализа комплексообразования фукоидана с лактоферрином были использованы динамическое рассеяние света (ДРС), атомно-силовая микроскопия (АСМ), флуоресцентная и инфракрасная (ИК) спектроскопия.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали рекомбинантный лактоферрин человека, выделенный из молока трансгенных коз (препарат “Капрабел”, был получен в Белорусском государственном университете и РУП “Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству”); фукоидан из *Fucus vesiculosus* 20–200 кДа, АТР, люминол, пероксид водорода, сульфат двухвалентного железа, трис(гидроксиметил)аминометан (трис), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиозолин-6-сульфокислоты) диамолиевая соль (ABTS) (“Sigma-Aldrich”, США); люциферин-люцифераза из светлячков (“Люмтек”, Россия); высокоориентированный пиролиитический графит (“НТ-МДТ”, Россия); наборы реагентов Коагуло-тест (ПГ-6) и Плазма Н (КМ-1) (“Ренам”, Россия).

Получение комплексов

Для оценки взаимодействия между фукоиданом и лактоферрином в полиэлектролитных комплексах биополимеры в 0,05 М трис-буфере (рН 7,1 или рН 7,4) смешивали таким образом, чтобы их массовые концентрации были одинаковыми, если это дополнительно не оговорено в тексте, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

ИК спектроскопия

ИК спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 (“Bruker”, Германия), оснащённом МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом (“Huber”, США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения BioATR-II (“Bruker”) с использованием кристалла однократного отражения ZnSe при 22°C и постоянной скорости продувки системы сухим воздухом аппаратом Jun-Air (“Gast Manufacturing Inc.”, США). На кристалл ячейки наносили аликвоту (50 мкл) образца, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000 см⁻¹ до 950 см⁻¹ с разрешением 1 см⁻¹, производили 70-кратное сканирование и усреднение. Фон без нанесения образца регистрировали аналогично. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0 (“Bruker”) с проведением процедуры вычитания фона, коррекции базовой линии и атмосферной компенсации. При необходимости использовали сглаживание по Савицкому-Голаю для удаления белого шума. Положение полос поглощения определяли по стандартной процедуре “Bruker”. Полосу поглощения Амид I подвергали процедуре деконволюции.

Измерение ζ -потенциала и гидродинамического диаметра

ζ -Потенциал фукоидана, лактоферрина и их комплекса, а также гидродинамический диаметр комплекса анализировали с помощью установки Zetasizer Nano ZS (“Malvern Instruments”, Германия), измеряя электрофоретическое и динамическое рассеяние света (ЭРС и ДРС соответственно). Для анализа использовали растворы биополимеров с концентрацией 1 мг/мл.

АСМ

Эксперименты были выполнены на атомно-силовом микроскопе с контроллером Ntegra Prima (“НТ-МДТ”) по протоколу АСМ-исследования отдельных молекул с высоким пространственным разрешением с использованием модифицированной N,N'-(декан-1,10-диил)бис(тетраглицидамино) (GM) поверхности высоко ориентированного пиролиитического графита [13]. Каплю свежеприготовленного водного раствора 0,01 мг/мл GM помещали на поверхность свежесколотого графита на 5–7 мин, а затем избыток жидкости удаляли с поверхности потоком азота. Для контрольных экспериментов раствор фукоидана наносили на поверхность модифицированного графита на 2–5 с. Каплю бидистиллированной воды 100-кратного объёма осторожно помещали на каплю раствора образца на 10 с и затем удаляли с поверхности в токе азота. АСМ-эксперименты проводили в полуконтактном режиме с типичной частотой сканирования 1 Гц и типичной свободной амплитудой в несколько нм. Все измерения проводили на воздухе с использованием сверхострых кремниевых кантилеверов с диаметром наконечника около 1 нм. Для получения максимально возможного разрешения АСМ при работе со сверхострыми кантилеверами применяли режим отталкивания. Использовали стандартные алгоритмы сглаживания АСМ-изображений (такие как вычитание квадратичной поверхности и усреднение по строкам). Для фильтрации, анализа и представления данных АСМ использовали программное обеспечение FemtoScan Online (“Центр перспективных технологий”, Россия).

Флуориметрия

Спектры флуоресценции остатков триптофана в лактоферрине регистрировали на спектрофлуориметре CM 2203 (“Solar”, Беларусь), используя длину волны возбуждения 280 нм и записывая спектр испускания в диапазоне 330–420 нм. Результаты представлены в виде интенсивности флуоресценции (I) при 334 нм, выраженной в относительных единицах.

Реакция Фентона

Для анализа способности биополимеров и их комплекса перехватывать гидроксильный радикал в кювету люминометра, содержащую 0,2 мМ люминол в 50 мМ трис-буфере с рН 7,4, добавляли 25 мкл исследуемого образца, H₂O₂ до концентрации 44,1 мМ и инициировали

реакцию внесением 17,9 мМ FeSO₄, регистрируя хемилюминесценцию (ХЛ) в непрерывном режиме. Объем пробы составлял 250 мкл. Оценивали максимальную интенсивность ХЛ ответа и представляли результат в % от контрольной пробы, содержащей вместо биополимеров 25 мкл трис-буфера.

Взаимодействие с катион-радикалом ABTS

Получение катион-радикала ABTS (ABTS^{•+}) и его реакции с фукоиданом и лактоферрином проводили по методике [14] с небольшими модификациями. Реакцию образования ABTS^{•+} осуществляли, смешивая водные растворы ABTS и персульфата калия (конечные концентрации 7,0 мМ и 2,45 мМ соответственно) и инкубируя смесь в темноте при комнатной температуре в течение 16–17 ч. Далее полученный раствор ABTS^{•+} разбавляли 0,05 М трис-буфером (рН 7,4) так, чтобы в контрольном образце поглощение при 734 нм составляло 0,70±0,02. Способность фукоидана и лактоферрина реагировать с ABTS^{•+} оценивали по снижению поглощения при 734 нм, проводя измерения через 10 мин, 20 мин и 30 мин после смешивания реагентов.

Коагулометрия

Антикоагулянтные свойства фукоидана определяли по увеличению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Для этого к 40 мкл плазмы крови человека добавляли 10 мкл водного раствора исследуемых соединений, смесь прогревали 1 мин при 37°C,

затем добавляли 50 мкл кефалин-каолиновой смеси, инкубировали 2 мин при 37°C и после внесения 50 мкл раствора 0,025 М хлорида кальция, прогретого при 37°C, фиксировали время образования фибринового сгустка. Измерения проводили на коагулометре с оптико-механическим способом регистрации АПГ4-03-Пх (“ЭМКО”, Россия). В работе использовали наборы реагентов “Ренам” (Россия).

Люциферин-люциферазная реакция

К разведению 1:50 готовой смеси люциферин-люциферазы в 0,05 М трис-буферном растворе с 5 мМ MgCl₂ (рН 7,8) добавляли АТР до 1 мкг/мл и начинали регистрацию ХЛ в непрерывном режиме; объем пробы составлял 250 мкл. Затем вносили 25 мкл раствора фукоидана или предварительно проинкубированной 30 мин при комнатной температуре смеси фукоидана с лактоферрином в разных концентрациях и оценивали их эффекты по степени снижения ХЛ относительно контроля с добавлением соответствующей аликвоты трис-буфера вместо растворов биополимеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структурные особенности комплекса фукоидан-лактоферрин

По данным АСМ, фукоидан представлял собой разветвленные цепочки высотой 1,0±0,3 нм (рис. 1А), а лактоферрин — белковые глобулы высотой 2,7±0,6 нм (рис. 1Б). Их распределение по размеру представлено на рисунке 1Г,Д. В случае

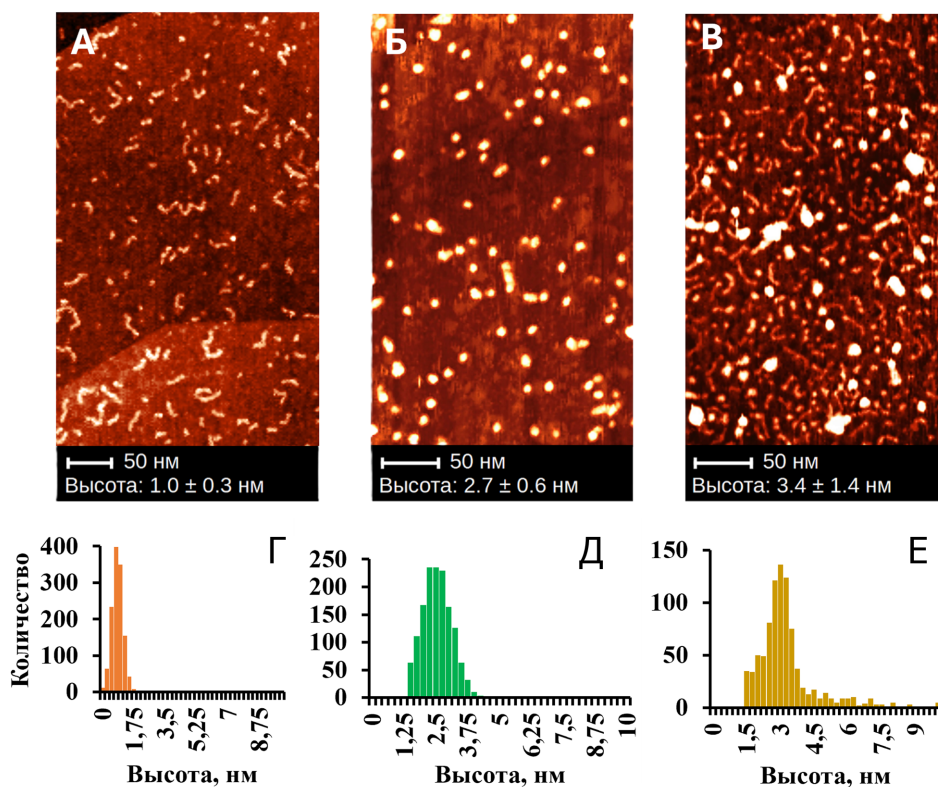


Рисунок 1. АСМ фукоидана (А), лактоферрина (Б) и их комплекса Ф-Л (В) и диаграммы распределения по высоте для фукоидана (Г), лактоферрина (Д) и их комплекса Ф-Л (Е). Концентрация водного раствора фукоидана и/или лактоферрина перед нанесением на подложку составляла 0,01 мг/мл.

СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ФУКОИДАНА С ЛАКТОФЕРРИНОМ

комплексов фукоидана и лактоферрина (Ф-Л) (рис. 1В) высота глобул увеличивалась и составляла $3,4 \pm 1,4$ нм (рис. 1В), при этом появлялись глобулы с высотой больше 4 нм (рис. 1Е).

Результаты измерения ζ -потенциала и гидродинамического диаметра для фукоидана, лактоферрина и комплекса Ф-Л, полученного при смешивании растворов биополимеров в равных массовых концентрациях в воде, подщелоченной с помощью NaOH до pH 8,0, представлены в таблице 1. Следует отметить, что в растворах с фукоиданом и комплексом Ф-Л происходило изменение конечного pH растворов в сторону нейтральных значений (от pH 8,0 до pH 7,0).

Образующиеся растворимые комплексы Ф-Л имели гидродинамический диаметр 382 нм и близкий к фукоидану отрицательный ζ -потенциал, что может объясняться нахождением на поверхности комплексов главным образом полисахарида, тогда как лактоферрин располагается преимущественно во внутренней области [11].

Для характеристики изменений структуры фукоидана была выбрана полоса при $1200\text{--}1300\text{ см}^{-1}$, которая соответствует колебаниям сульфатной группы [2]. Наблюдался сдвиг пика фукоидана от 1249 см^{-1} до 1251 см^{-1} в комплексе с лактоферрином (рис. 2).

В то же время по данным ИК спектроскопии при образовании полиэлектролитного комплекса Ф-Л в лактоферрине не изменялось содержание

Таблица 1. Характеристика фукоидана, лактоферрина и их комплекса Ф-Л при растворении в воде с pH 8 (по данным ЭРС и ДРС)

Образец	ζ -потенциал, мВ	Диаметр, нм
Фукоидан	$-59,5 \pm 4,9$	—
Лактоферрин	$-4,8 \pm 1,8$	—
Ф-Л	$-48,5 \pm 3,3$	382 ± 20

Примечание: концентрация каждого компонента — 1 мг/мл.

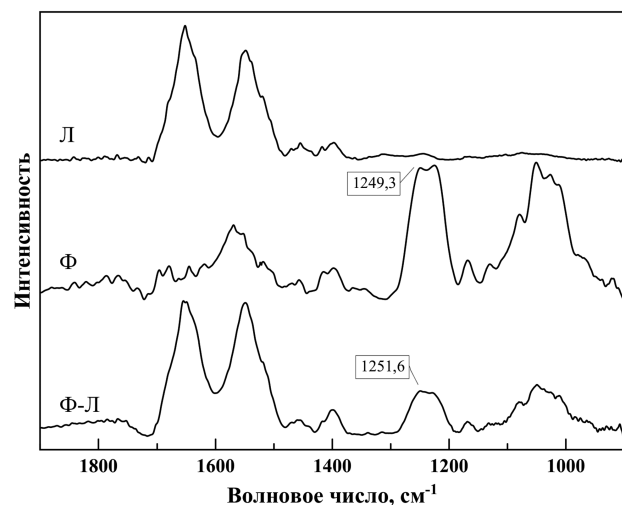


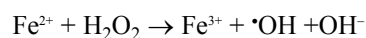
Рисунок 2. ИК спектры лактоферрина (Л), фукоидана (Ф) и их комплекса Ф-Л при концентрации каждого компонента 2,5 мг/мл в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,4.

α -спиралей, β -листов, β -поворотов и неупорядоченных структур (Дополнительные материалы, рис. S1), что свидетельствует о сохранении структуры белка.

Для дополнительного анализа структуры лактоферрина в комплексах Ф-Л была использована флуоресценция остатков триптофана. Измеряли флуоресценцию исходного раствора лактоферрина и после его инкубации с фукоиданом в течение 30 мин в 0,05 М трис-буфере, pH 7,4. Не было выявлено различий в спектре флуоресценции, указывающих на изменение структуры лактоферрина в результате образования его комплекса с фукоиданом: интенсивность флуоресценции составляла $1,15 \pm 0,09$ отн. ед. в случае раствора лактоферрина (0,05 мг/мл) и $1,14 \pm 0,11$ отн. ед. в случае комплекса Ф-Л с такой же концентрацией каждого компонента (Дополнительные материалы, рис. S2). По-видимому, образование комплекса Ф-Л сопровождается структурными изменениями в молекулах фукоидана, но не лактоферрина.

Функциональные особенности комплексов фукоидана с лактоферрином

Антиокислительная активность. Оценка перехватывающей способности полисахаридов в отношении гидроксильных радикалов является одним из широко распространённых подходов к анализу их антиокислительных свойств [8]. В качестве источника гидроксильного радикала, как правило, используют реакцию Фентона:



Образование радикала оценивают с помощью спектрофотометрии [15], люминол-зависимой ХЛ [16] или ЭПР-спектроскопии [17]. По данным различных исследователей, эффекты фукоидана регистрируются при концентрациях от 0,1 мг/мл [18].

Фукоидан и лактоферрин снижали ХЛ в реакции Фентона дозозависимым образом (рис. 3). Концентрация, вызывающая 50%-ное ингибирование ХЛ (IC_{50}) для фукоидана составляла около 0,07 мг/мл, а для лактоферрина — около 0,4 мг/мл (рис. 3А).

Антиоксидантный эффект комплекса Ф-Л в реакции Фентона был выражен сильнее, чем при внесении биополимеров в той же концентрации, но по отдельности (рис. 3Б). Поскольку лактоферрин в концентрации 0,06 мг/мл не снижал ХЛ ответ, усиление антиокислительной активности при образовании комплекса может объясняться изменением фукоидана в результате межмолекулярных взаимодействий.

Ещё одним широко используемым показателем антиокислительной активности является перехватывающая способность биополимеров в отношении катион-радикала ABTS ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) [8, 9]. В концентрации 0,5 мг/мл лактоферрин за 30 мин снижал оптическое поглощение $\text{ABTS}^{\cdot+}$ на $44 \pm 3\%$, как и комплекс Ф-Л, который вызывал снижение на $42 \pm 2\%$ (Дополнительные материалы, рис. S3). Эффект фукоидана при данной концентрации (0,5 мг/мл) не превышал $8 \pm 1\%$.

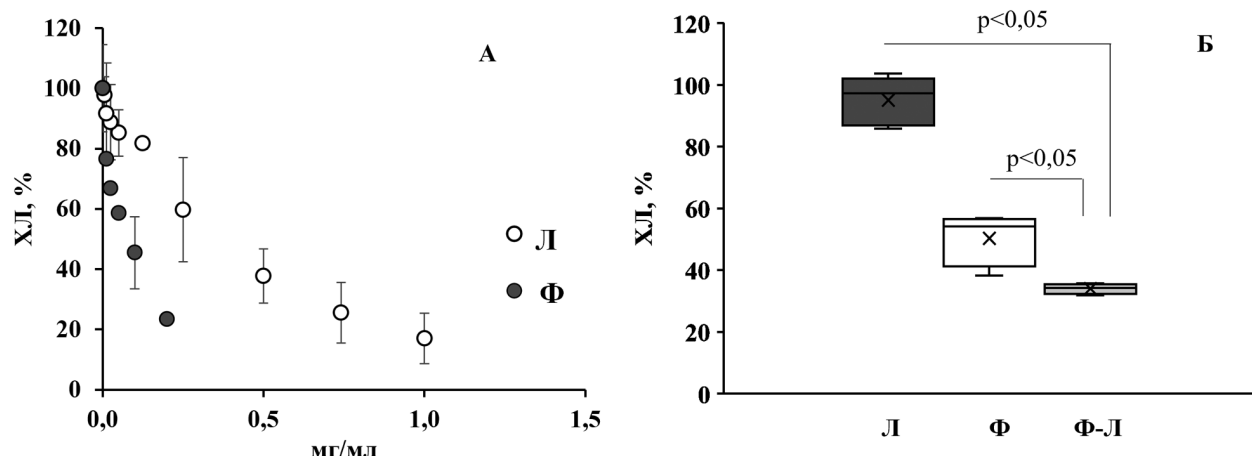


Рисунок 3. Снижение величины люминол-зависимого ХЛ ответа в реакции Фентона: **А** – в зависимости от концентрации фукоидана (Ф) или лактоферрина (Л); **Б** – под действием 0,06 мг/мл лактоферрина (Л) или фукоидана (Ф) по отдельности и в их комплексе (Ф-Л). Измерения проводили в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,4. Контролем служили пробы без биополимеров. Результаты представлены в % от контрольных значений.

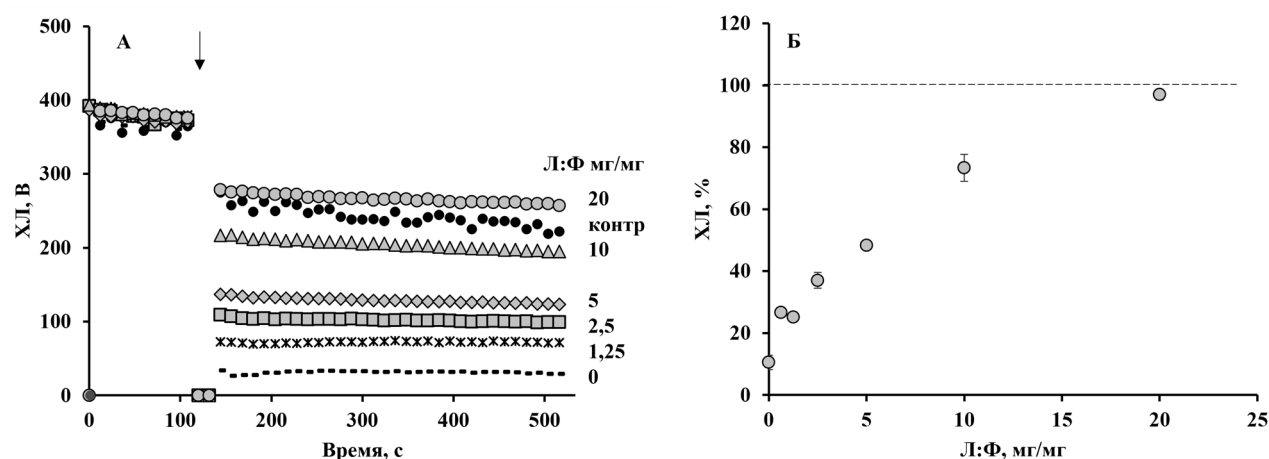


Рисунок 4. ХЛ ответ люциферин-люциферазы на АТФ в зависимости от соотношения лактоферрин:фукоидан (Л:Ф, мг/мг) в их комплексе Ф-Л при концентрации фукоидана 0,2 мг/мл: **А** – кинетика ХЛ (момент добавления смеси обозначен стрелкой); **Б** – ХЛ в % от величины в момент перед добавлением смеси. Предварительную инкубацию смеси лактоферрина с фукоиданом проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Контролем служила проба без добавления лактоферрина и фукоидана.

Из сопоставления результатов обоих методов следует, что образование комплекса усиливает антиоксидательную активность фукоидана, но не лактоферрина.

Ингибирование люциферин-люциферазной реакции. Взаимодействие фукоидана с белками может приводить к изменению их функциональной активности в различных системах. Так, связывание белка C1q комплемента с фукоиданом предотвращает лизис этого белка трипсином и тем самым препятствует активации классического пути комплемента [19], а связывание низкомолекулярного фукоидана с катионным пептидом мелиттином ослабляет гемолитическое действие последнего [20]. На основании предварительного исследования для анализа эффектов комплекса Ф-Л была выбрана люцифераза светлячков (рI 6,2–6,3), которая в присутствии люциферина дает стойкий ХЛ сигнал при добавлении АТФ [21].

ХЛ сигнал индуцировали добавлением АТФ к раствору люциферин-люциферазы в 50 мМ трис-буфере с 10 мМ $MgCl_2$ (рН 7,4), а затем вносили раствор фукоидана либо предварительно полученный комплекс Ф-Л с соотношением Л:Ф от 1,25 до 20 мг/мг при концентрации фукоидана 0,2 мг/мл (рис. 4А).

Фукоидан снижал ХЛ в зависимости от концентрации ($IC_{50} \approx 0,05$ мг/мл), а в комплексе с лактоферрином его ингибирующее действие ослабевало по мере увеличения концентрации белка. Как видно из кривой, представленной на рисунке 4Б, при соотношении Л:Ф, равном 20 мг/мг, ингибирующий эффект фукоидана отсутствовал. По-видимому, по мере увеличения числа молекул лактоферрина, связывающихся с полисахаридом, доступность фукоидана для взаимодействия с люциферазой снижалась. Можно предположить, что фукоидан взаимодействует с лизином в активном центре фермента [22], как в случае белка

комплемента C1q [23], что приводит к ингибированию активности фермента, а лактоферрин, связываясь с фукоиданом, экранирует участки и группы полисахарида, участвующие в этом взаимодействии.

Антикоагулянтная активность. Антикоагулянтную активность фукоидана (рис. 5А) и фукоидана в комплексе с лактоферрином (рис. 5Б) определяли по их влиянию на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Известно, что антикоагулянтная активность фукоидана обусловлена не только прямым связыванием с тромбином, но и его взаимодействием с природным ингибитором тромбина — антитромбином III (АТ III). В результате, в присутствии АТ III ингибиторная активность фукоидана по отношению к тромбину возрастает [24]. В наших экспериментах фукоидан (0,01–0,1 мг/мл) дозозависимым образом увеличивал время свёртывания плазмы крови (рис. 5А), в то время как лактоферрин в диапазоне концентраций 0,025–0,25 мг/мл не оказывал существенного влияния на АЧТВ (рис. 5Б).

При введении в плазму комплексов, полученных при смешивании фукоидана (0,05 мг/мл) и лактоферрина с возрастающими концентрациями (от 0,025 мг/мл до 0,25 мг/мл) наблюдали дозозависимое уменьшение АЧТВ (рис. 5Б). Это можно объяснить тем, что в отличие от свободного фукоидана у молекул фукоидана в комплексе с лактоферрином оказываются экранированными участки, участвующие во взаимодействии с ферментами свёртывающей системы крови. Аналогичные результаты были получены при измерении протромбинового и тромбинового времени (Дополнительные материалы, рис. S4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка новых многофункциональных средств доставки лекарственных веществ включает в себя задачи по изучению взаимного влияния биологически активных компонентов и особенностей их взаимодействия. Так, стабильность и биодоступность лактоферрина в различных средах

может возрастать за счёт образования комплексов как с анионными полисахаридами (каррагинаном и ксантановой камедью), так и с нейтральными (камедь рожкового дерева). В первом случае в образовании комплексов белка с полисахаридами участвуют электростатические взаимодействия, а во втором — гидрофобные [12].

Фукоидан, обладающий широким спектром эффектов в биологических системах, в отличие от лактоферрина при физиологических значениях pH заряжен отрицательно, что позволяет получать растворимые комплексы и наночастицы при смешивании этих биополимеров [11]. Отрицательный заряд этих структур авторы работы [11] объясняют расположением фукоидана снаружи, а лактоферрина — внутри, что согласуется с нашими результатами. По данным авторов, частицы, полученные из фукоидана и лактоферрина при pH 3 и массовом соотношении 1:1, достигали размера в $248 \pm 1,3$ нм, т.е. были в 1,3 раза меньше, чем в нашей работе (табл. 1).

Согласно работе [12] межмолекулярное взаимодействие лактоферрина с полисахаридами при pH 7–8 не влияет на структуру белка при массовом соотношении лактоферрина к полисахариду более 1. Это подтверждается полученными в настоящей работе данными ИК спектроскопии и флуориметрии для комплексов Ф-Л с массовым соотношением 1:1.

При нейтральных значениях pH фукоидан и лактоферрин несут разноимённый заряд, что способствует образованию более прочного полиэлектролитного комплекса, чем комплекс фукоидана с люциферазой, имеющей pI 6,2–6,3.

Нет данных, раскрывающих прямую связь между особенностями структуры фукоидана и его активностью, в первую очередь, антиокислительной и антикоагулянтной [8, 24]. По-видимому, важную роль играет распределение сульфатных групп и общая конфигурация молекулы, а также присутствие примесей в молекуле полисахарида [25]. В то же время антиокислительная активность лактоферрина в реакции с радикалом ABTS^{•+} сохранялась и в комплексе с фукоиданом, что может объясняться отсутствием значительных конформационных изменений

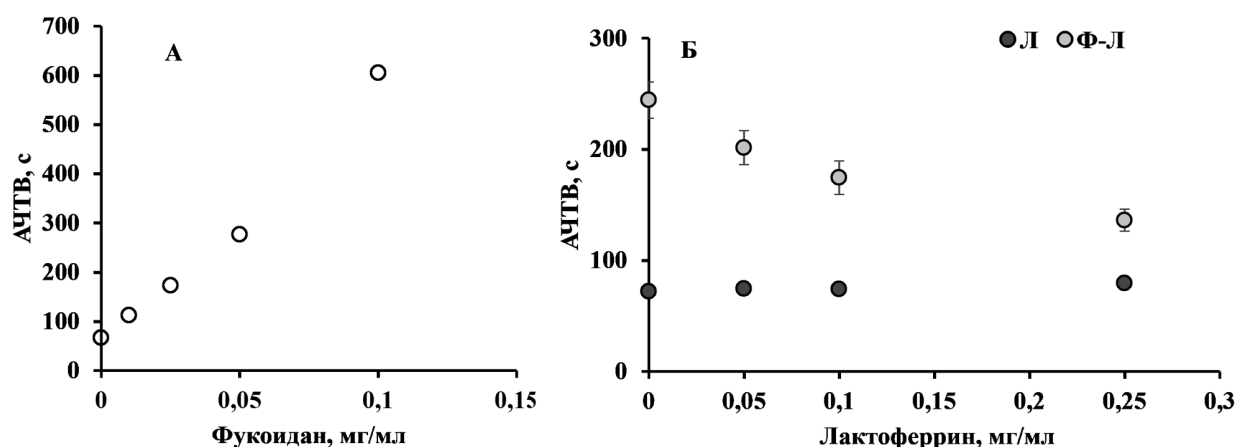


Рисунок 5. Изменение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ): А – под действием разных концентраций фукоидана (Ф), Б – под действием разных концентраций лактоферрина (Л) отдельно и в комплексе с 0,05 мг/мл фукоидана (Ф-Л).

в структуре белка в комплексе с фукоиданом. Поскольку наибольший вклад в реакции с ABTS^{•+} вносят тирозин, триптофан, цистеин [26], полученный результат согласуется с данными об отсутствии изменений во флуоресценции триптофана в молекуле лактоферрина под действием фукоидана.

Антиоксидантное действие лактоферрина в реакции Фентона обусловлено прямым перехватом гидроксильных радикалов так называемыми “жертвенными аминокислотами”, такими как гистидин, лизин, аргинин и др. [17, 27]. Это может обуславливать быстрое повреждение молекул белка и в итоге менее выраженный, чем у фукоидана эффект в реакции Фентона, в том числе, и в комплексе с фукоиданом.

Наши результаты позволяют предположить, что образование комплексов Ф-Л при массовом соотношении 1:1 позволяет обеспечить конформацию для достижения детектируемых эффектов. Конформационные изменения фукоидана при связывании с лактоферрином подтверждаются сдвигом пика, соответствующего сульфатным группам (от 1220 см⁻¹ до 1224 см⁻¹) [2]. В работе [4] показано, что отрицательно заряженные сульфатные группы фукоидана реагируют с положительно заряженными участками белковых молекул, например, с остатками аргинина. Кроме того, авторы обосновывают участие гидроксильных групп тирозина в образовании водородных связей с акцепторами водородной связи в сульфатных группах фукоидана [4].

Возможность контролировать антикоагулянтную активность фукоидана за счёт образования комплексов с лактоферрином позволила бы расширить применение фукоидан-содержащих препаратов при воспалении, например, при истончении слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и риске язвенных повреждений [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растворимый полиэлектролитный комплекс фукоидана с лактоферрином (Ф-Л), полученный при соотношении Ф:Л = 1:1 по массе при нейтральных значениях pH, обладает большей антиоксидантной активностью в реакции Фентона по сравнению со свободным фукоиданом. В комплексе с лактоферрином снижается антикоагулянтное действие фукоидана и его ингибирующая способность в отношении люциферазы в модельной системе. Полученные результаты позволяют рассматривать образование комплекса фукоидана с лактоферрином как путь к разработке средств доставки с контролируемой биологической активностью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке совместного гранта Российского научного фонда (грант № 23-45-10026) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б23РНФ-093), с использованием оборудования, приобретённого

на средства Программы развития Московского государственного университета (ИК-спектрометр Фурье Tensor 27, установка Zetasizer Nano ZS) и средств по регистрационной теме № 121041500039-8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolstoguzov V. (2002) Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **22**(2), 89–174. DOI: 10.1080/07388550290789478
2. Gruškieienė R., Galinskaitė A., Kavleiskaja T., Vepškaitė-Monstavičė I., Servienė E., Sereikaitė J. (2024) Application of fucoidan for the encapsulation of yeast K2 toxin. *Carbohydrate Polymer Technologies Applications*, **7**, 100521. DOI: 10.1016/j.carpta.2024.100521
3. Balabushevich N.G., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Mosievich D.V., Mishin P.I., Bogomiakova M.E., Lebedeva O.S., Murina M.A., Klinov D.V., Obratsova E.A., Kharaeva Z.F., Firova R.K., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Panasenko O.M., Mikhalechik E.V. (2024) Influence of natural polysaccharides on the morphology and properties of hybrid vaterite microcrystals. *Heliyon*, **10**(13), e33801. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e33801
4. Zayed A., Al-Saedi D.A., Mensah E.O., Kanwugu O.N., Adadi P., Ulber R. (2023) Fucoidan's molecular targets: a comprehensive review of its unique and multiple targets accounting for promising bioactivities supported by *in silico* studies. *Marine Drugs*, **22**(1), 29. DOI: 10.3390/md22010029
5. Burova T.V., Grinberg N.V., Dubovik A.S., Plashina I.G., Usov A.I., Grinberg V.Y. (2022) β -Lactoglobulin-fucoidan nanocomplexes: energetics of formation, stability, and oligomeric structure of the bound protein. *Food Hydrocolloids*, **129**, 107666. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.107666
6. Haggag Y.A., Abd Elrahman A.A., Ulber R., Zayed A. (2023) Fucoidan in pharmaceutical formulations: a comprehensive review for smart drug delivery systems. *Marine Drugs*, **21**(2), 112. DOI: 10.3390/md21020112
7. Mensah E.O., Kanwugu O.N., Panda P.K., Parise Adadi P. (2023) Marine fucoidans: structural, extraction, biological activities and their applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, **142**, 108784. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2023.108784
8. Имбс Т.И., Ермакова С.П. (2021) Являются ли фукоиданы бурых водорослей антиоксидантами? *Биология моря*, **47**(3), 147–152. [Imbs T.I., Ermakova S.P. (2021) Can fucoidans of brown algae be considered as antioxidants? *Russian Journal of Marine Biology*, **47**(3), 157–161.] DOI: 10.31857/S0134347521030050

9. Ermilov F., Zhurishkina E., Vlasova E., Skorik Y., Kulminsaya A., Lapina I. (2025) Effect of polyphenolic impurities on antibacterial and antioxidant activities of fucoidans from Barents Sea *Fucus vesiculosus*. J. Appl. Phycol., **37**(4), 2869–2883. DOI: 10.1007/s10811-025-03526-9
10. Liu N., Feng G., Zhang X., Hu Q., Sun S., Sun J., Sun Y., Wang R., Zhang Y., Wang P., Li Y. (2021) The functional role of lactoferrin in intestine mucosal immune system and inflammatory bowel disease. Front. Nutr., **8**, 759507. DOI: 10.3389/fnut.2021.759507
11. Xi X., Wei Z., Xu Y., Xue C. (2023) Clove essential oil Pickering emulsions stabilized with lactoferrin/fucoidan complexes: stability and rheological properties. Polymers, **15**(8), 1820. DOI: 10.3390/polym15081820
12. Meng Q., Jiang H., Tu J., He Y., Zhou Z., Wang R., Jin W., Han J., Liu W. (2024) Effect of pH, protein/polysaccharide ratio and preparation method on the stability of lactoferrin-polysaccharide complexes. Food Chem., **456**, 140056. DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.140056
13. Klinov D., Dwir B., Kapon E., Borovok N., Molotsky T., Kotlyar A. (2007) High-resolution atomic force microscopy of duplex and triplex DNA molecules. Nanotechnology, **18**(22), 225102. DOI: 10.1088/0957-4484/18/22/225102
14. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med., **26**(9–10), 1231–1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
15. Smirnoff N., Cumbes Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry, **28**(4), 1057–1060. DOI: 10.1016/0031-9422(89)80182-7
16. Miyamoto A., Nakano S., Nagai K., Kishikawa N., Ohyama K., Aoyama T., Matsumoto Y., Kuroda N. (2017) Development of an evaluation method for hydroxyl radical scavenging activities using sequential injection analysis with chemiluminescence detection. Anal. Sci., **33**(6), 697–701. DOI: 10.2116/analsci.33.697
17. Nagy I., Floyd R.A. (1984) Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. Biochim. Biophys. Acta, **790**(3), 238–250. DOI: 10.1016/0167-4838(84)90028-1
18. Kordjazi M., Etemadian Y., Shabanpour B., Pourashouri P. (2019) Chemical composition antioxidant and antimicrobial activities of fucoidan extracted from two species of brown seaweeds (*Sargassum ilicifolium* and *S. angustifolium*) around Qeshm Island. Iranian Journal of Fisheries Sciences, **18**(3), 457–475. DOI: 10.22092/IJFS.2018.115491
19. Tissot B., Gonnet F., Iborra A., Berthou C., Thielens N., Arlaud G.J., Daniel R. (2005) Mass spectrometry analysis of the oligomeric C1q protein reveals the B chain as the target of trypsin cleavage and interaction with fucoidan. Biochemistry, **44**(7), 2602–2609. DOI: 10.1021/bi047802h
20. Mavlonov G., Lee J., Shin L., Yi T., Abdurakhmonov I. (2011) Low molecular fucoidan and its macromolecular complex with bee venom melittin. Adv. Biosci. Biotechnol., **2**(4), 298–303. DOI: 10.4236/abb.2011.24043
21. Ломакина Г.Ю., Безруких А.Е., Угарова Н.Н. (2012) Влияние желатины на свойства люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Вестник МГУ. Сер. 2 Химия, **53**(1), 12–17. [Lomakina G.Y., Bezrukikh A.E., Ugarova N.N. (2012) Effect of gelatin on properties of *Luciola mingrelica* firefly luciferase. Moscow Univ. Chem. Bull., **67**, 8–12.] DOI: 0.3103/S0027131412010051
22. Leach F.R. (2008) A view on the active site of firefly luciferase. Nat. Prod. Commun., **3**(9), 1437–1448. DOI: 10.1177/1934578X0800300908
23. Tissot B., Montdargent B., Chevolot L., Varenne A., Descroix S., Gareil P., Daniel R. (2003) Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway. Biochim. Biophys. Acta, **1651**(1–2), 5–16. DOI: 10.1016/s1570-9639(03)00230-9
24. Ушакова Н.А., Морозевич Г.Е., Устюжанина Н.Е., Билан М.И., Усов А.И., Нифантьев Н.Э., Преображенская М.Е. (2008) Антикоагулянтная активность фукоиданов из бурых водорослей. Биомедицинская химия, **54**(5), 597–606. [Ushakova N.A., Morozovich G.E., Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Usov A.I., Nifantiev N.E., Preobrazhenskaya M.E. (2008) Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae. Biomeditsinskaya Khimiya, **54**(5), 597–606.]
25. Wang J., Hu S., Nie S., Yu Q., Xie M. (2016) Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides. Oxid. Med. Cell. Longev., **2016**, 5692852. DOI: 10.1155/2016/5692852
26. Zheng L., Zhao M., Xiao C., Zhao Q., Su G. (2016) Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: importance of controlling reaction pH and time. Food Chem., **192**, 288–294. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.015
27. Ogasawara Y., Imase M., Oda H., Wakabayashi H., Ishii K. (2014) Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage. Int. J. Mol. Sci., **15**(1), 1003–1013. DOI: 10.3390/ijms15011003
28. Renaldi K., Simadibrata M., Syam A.F., Rani A.A., Krisnuhoni E. (2011) Influence of fucoidan in mucus thickness of gastric mucosa in patients with chronic gastritis. The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy, **12**(2), 79–84. DOI: 10.24871/122201179-84

Поступила в редакцию: 09.09.2025.
После доработки: 01.10.2025.
Принята к печати: 02.10.2025.

FUNCTIONAL ACTIVITY FEATURES OF LACTOFERRIN-FUCOIDAN COMPLEXES
IN MODEL SYSTEMS *IN VITRO*

*D.V. Mosievich^{1,2}, N.G. Balabushevich², P.I. Mishin², I.M. Le-Deygen², L.Y. Filatova², O.M. Panasenko¹,
M.A. Murina¹, T.V. Vakhrusheva¹, N.A. Barinov¹, O.V. Pobeguts¹, M.A. Galyamina¹, I.V. Gorudko³,
D.V. Grigorieva³, K.F. Pashkevich³, A.V. Sokolov^{1,4}, E.V. Mikhalechik^{1*}*

¹Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: lemik2007@yandex.ru

²Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia

³Belarusian State University, 4 Nezavisimosti ave., Minsk, 220030 Belarus

⁴Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17 Prof. Popova str., Saint Petersburg, 197022 Russia

Fucoidan, an anionic polysaccharide from brown algae, demonstrates anticoagulant, antioxidant, anti-inflammatory, antitumor, and antiviral activities. It can form polyelectrolyte complexes with various proteins, including the therapeutically important protein lactoferrin. The aim of this study was to investigate the physicochemical and functional properties of a fucoidan-lactoferrin complex formed by mixing their solutions at physiological pH. The complex, detected using atomic force microscopy, had a negative charge and a hydrodynamic diameter of 382 nm. Interaction with lactoferrin changed the IR spectrum of fucoidan in the absorption band in the range of 1220–1260 cm⁻¹, corresponding to vibrations of the sulfate group. It increased the total antioxidant activity of biopolymers in the Fenton reaction and reduced the anticoagulant activity of fucoidan, assessed by determining the activated partial thromboplastin time. Fucoidan reduced luciferase activity in a luciferin-luciferase model system, and complex formation with lactoferrin attenuated the inhibitory capacity of fucoidan. These results demonstrate the possibility of targeted influence on the functional activity of biopolymers during complex formation and prospects for using fucoidan and lactoferrin as a complex in the development of new drugs and drug delivery systems.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: lactoferrin; fucoidan; polyelectrolyte complexes; antioxidant activity; anticoagulants; luciferin-luciferase

Funding. This research was funded by a joint grant from the Russian Science Foundation (project no. 23-45-10026) and the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project no. B23RNF-093), with the use of devices purchased according to the Development Program of Lomonosov Moscow State University (Spectrometer Tensor 27 FT-IR, Zetasizer Nano ZS system) and registration theme no. 121041500039-8.

Received: 09.09.2025; revised: 01.10.2025; accepted: 02.10.2025.