

МЕДИЦИНА**MEDICINE**

УДК 612.616:616-003.725

Поступило в редакцию 27.10.2016

Received 27.10.2016

Ю. А. Рудниченко, В. С. Лукашевич, член-корреспондент И. В. Залуцкий*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь***ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА
НА УРОВЕНЬ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ У САМЦОВ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

Системное введение рекомбинантного лактоферрина человека молодым (2 мес.) крысам-самцам вызывало увеличение уровня общего тестостерона в сыворотке крови на 200 %. После завершения курсового введения содержание тестостерона оставалось повышенным ($p < 0,05$) в течение семи недель, постепенно возвращаясь до значений контрольной группы без угнетения биосинтеза эндогенного тестостерона.

В модели возрастного гипогонадизма системное влияние *per os* рекомбинантного лактоферрина человека экспериментальным животным оказывало значительное стимулирующее действие на биосинтез тестостерона у 2-летних особей, нормализуя его уровень до физиологических значений молодых крыс.

Ключевые слова: рекомбинантный человеческий лактоферрин, половые гормоны, возрастной гипогонадизм.

Ju. A. Rudnichenko, U. S. Lukashevich, Corresponding Member I. V. Zalutsky*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***INFLUENCE OF HUMAN RECOMBINANT LACTOFERRIN ON THE LEVEL OF SEX HORMONES
IN MALE RATS OF DIFFERENT AGE**

A systemic administration of human recombinant lactoferrin to male rats caused an increase in a total testosterone level by 200 % in blood serum, the estradiol concentration decreased significantly by 16.7 %. Upon completion of administration, testosterone was still increased ($p < 0.05$) for 7 weeks, gradually returning to the control group values without inhibition of endogenous testosterone synthesis. In contrast, the level of estradiol returned to control values.

Our study of the rat model of age-related hypogonadism revealed that a systemic *per os* administration of human recombinant lactoferrin to experimental animals had a significant stimulatory effect on testosterone biosynthesis in 2-year-olds, restoring it to the level of physiological values in young rats.

Keywords: recombinant human lactoferrin, sex hormones, age-related hypogonadism.

Введение. Развитие андрогенного дефицита у мужчин является актуальной медицинской проблемой. Основным методом лечения такой патологии остается заместительная андрогенная терапия [1]. Главным ее недостатком является угнетение собственного синтеза эндогенного тестостерона или полное его прекращение в организме после отмены заместительной андрогенной терапии [2].

В рамках выполнения программы Союзного государства «БелРосТрансген-2» из молока трансгенных коз получен рекомбинантный лактоферрин человека (рчЛФ) – один из основных белковых компонентов молока, негемовый железосвязывающий гликопротеин, относимый к семейству трансферринов [3]. Он обладает антиоксидантной активностью, противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами, участвует в регуляции роста и дифференцировки клеток и др. [4]. Особого внимания заслуживает его влияние на гормональный статус организма, а точнее, продемонстрированная способность увеличивать уровень тестостерона в крови [5]. При этом в доступной литературе отсутствуют сведения о механизме влияния рчЛФ на метабо-

лизм стероидных гормонов в организме. Перспективными являются исследования, направленные на изучение возможности коррекции эндогенного уровня тестостерона в рамках профилактических мероприятий или при комплексной терапии гипогонадизма различной этиологии. Не изученным остается также вопрос, угнетается ли синтез эндогенного тестостерона после завершения системного воздействия рчЛФ, как это происходит при традиционной гормональной терапии.

Цель исследования – изучение влияния рчЛФ на биосинтез тестостерона у молодых крыс-самцов, а также на компенсацию возрастного гипогонадизма у этих животных.

Материалы и методы исследования. На I этапе исследований проводили изучение отсроченного влияния рчЛФ на молодых (2 мес.) крысах-самцах ($n = 116$) массой 250 ± 20 г. Крысы-самцы были разделены на две группы. Первая группа (контрольная) получала *per os* ежедневно изотонический раствор NaCl в объеме 0,1 мл. Особям второй группы (экспериментальная) ежедневно вводили *per os* рчЛФ в дозе 100 мг/кг массы тела животного в течение 2,5 месяцев. Животных выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом через 1, 3, 7, 11 недель, получали сыворотку крови.

На II этапе исследований проводили изучение влияния рчЛФ в экспериментальной модели возрастного гипогонадизма крыс-самцов ($n = 61$). В качестве экспериментальной модели возрастного гипогонадизма были использованы особи возрастом 2 года массой 480 ± 30 г, что примерно соответствует 60-летнему возрасту человека [6]. Было сформировано пять групп. Первая группа – половозрелые крысы-самцы (2 мес.) массой 250 ± 30 г, которые получали ежедневно *per os* изотонический раствор NaCl. Вторая и четвертая группы – особи возрастом 2 года, которые находились в опыте 1 и 2,5 месяца получали ежедневно *per os* изотонический раствор NaCl (возрастной гипогонадизм). Третья и пятая группы – крысы-самцы возрастом 2 года, которые ежедневно получали *per os* рчЛФ в дозе 100 мг/кг массы тела животного на протяжении 1 и 2,5 месяца. После снятия животных с опыта получали сыворотку крови.

Содержание общего и свободного тестостерона, эстрадиола, прогестерона и 17-ОН прогестерона в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов фирмы «Хема» (РФ).

Экспериментальные данные обработаны с помощью MS Excel, Origin 6.1 и представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й процентиль – 75-й процентиль) – (25 %; 75 %).

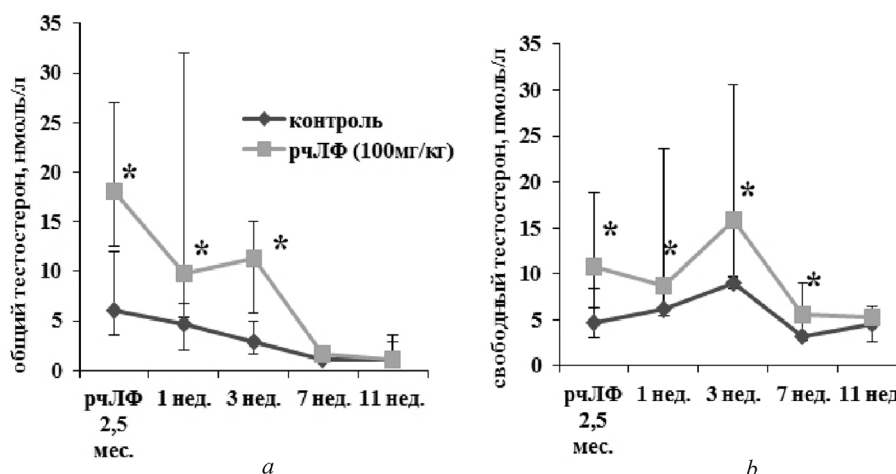


Рис. 1. Уровень общего (a) и свободного тестостерона (b) в сыворотке крови крыс после завершения системного введения рекомбинантного лактоферрина человека в течение 2,5 месяца: * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$, Me 25 %–75 %, $n = 8-14$); рчЛФ 2,5 мес. – группа, получавшая *per os* рчЛФ (100 мг/кг) на протяжении 2,5 мес., 1 нед., 3 нед., 7 нед., 11 нед. – период после завершения системного введения рчЛФ

Fig. 1. Level of total (a) and free testosterone (b) in the rat blood serum upon completion of a systemic administration of human recombinant lactoferrin during 2.5 months: * – reliable differences from the control group ($p < 0.05$, Me 25 %–75 %, $n = 8-14$); human recombinant lactoferrin during 2.5 months – the group taking *per os* human recombinant lactoferrin (100 mg/kg) during 2.5 months, 1 week, 3 weeks, 7 weeks, 11 weeks – period upon completion of a systemic administration of human recombinant lactoferrin

Для сравнения групп по одному признаку применяли *U*-критерий Манна–Уитни для независимых выборок с использованием пакета программ Statistica 6.0. Достоверным считали уровень значимости $p \leq 0,05$.

Установлено, что при введении *per os* рчЛФ на протяжении 2,5 месяца уровень общего и свободного тестостерона в сыворотке крови крыс достоверно повышался на 200 и 128,8 % соответственно (рис. 1, *a, b*).

После завершения курсового потребления рчЛФ содержание общего тестостерона в сыворотке крови на протяжении трех недель было достоверно увеличено в 2,1 и 4 раза (1-я и 3-я неделя соответственно), а к 7-й неделе – восстанавливалось до уровня контрольных значений. Концентрация свободного тестостерона была также статистически значимо повышена в течение семи недель в 1,4, 1,8 и 1,8 раза (1-я, 3-я и 7-я неделя соответственно).

Уровень прогестерона в сыворотке крови не имел существенных отличий от контрольной группы на всех сроках исследования (табл. 1). Концентрация 17-ОН прогестерона достоверно увеличивалась на 45,6 % (1-я неделя), а на 3-й неделе был отмечен незначительный рост на 17,8 %.

Т а б л и ц а 1. Уровень предшественников тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови крыс после завершения системного введения рекомбинантного лактоферрина человека в течение 2,5 месяца

Table 1. Level of testosterone and estradiol precursors in the rat blood serum upon completion of a systemic administration of human recombinant lactoferrin during 2.5 months

Показатель Index	Группа Group	+ЛФ +Lactoferrin	–ЛФ –Lactoferrin			
			1 нед. 1 week	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	11 нед. 11 weeks
Прогестерон, нмоль/л Progesterone, nmol/l	контроль control	4,00 (3,00; 4,50)	4,05 (3,20; 5,99)	7,38 (4,45; 9,10)	4,05 (2,65; 4,47)	3,10 (2,56; 4,25)
	рчЛФ (100 мг/кг) human recombinant lactoferrin (100 mg/kg)	3,50 (2,60; 4,46)	5,20 (2,90; 8,35)	4,70 (2,97; 12,00)	2,45 (2,13; 3,23)	2,47 (2,28; 2,81)
17-ОН прогестерон, нмоль/л 17-OH progesterone, nmol/l	контроль control	0,47 (0,40; 0,72)	1,49 (1,40; 1,80)	1,87 (1,82; 2,10)	1,21 (0,94; 1,31)	1,18 (0,88; 1,30)
	рчЛФ (100 мг/кг) human recombinant lactoferrin (100 mg/kg)	0,61 (0,50; 0,69)	2,17 (1,97; 2,54)*	2,20 (1,91; 2,83)	1,13 (0,88; 1,27)	0,74 (0,63; 0,95)
Эстрадиол, нмоль/л Estradiol, nmol/l	контроль control	0,22 (0,18; 0,24)	0,22 (0,21; 0,23)	0,25 (0,23; 0,27)	0,21 (0,19; 0,23)	0,22 (0,21; 0,24)
	рчЛФ (100 мг/кг) human recombinant lactoferrin (100 mg/kg)	0,18 (0,15; 0,21)*	0,23 (0,22; 0,25)	0,26 (0,24; 0,28)	0,23 (0,19; 0,24)	0,21 (0,19; 0,24)

П р и м е ч а н и е: * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$, Me; 25 %–75 %, $n = 9–10$). +ЛФ – группа, получавшая *per os* рчЛФ (100 мг/кг) на протяжении 2,5 месяца; –ЛФ – после завершения системного введения рчЛФ.

N o t e: * – reliable differences from the control group ($p < 0.05$, Me; 25 %–75 %, $n = 9–10$). +Lactoferrin – group taking *per os* human recombinant lactoferrin (100 mg/kg) during 2.5 months; –Lactoferrin – upon completion of a systemic administration of human recombinant lactoferrin.

Пероральное введение рчЛФ в течение 2,5 месяца приводило к достоверному уменьшению концентрации эстрадиола в сыворотке крови крыс на 16,7 %. Отмена потребления лактоферрина привела к восстановлению уровня эстрадиола до контрольных значений.

Анализ результатов по системному влиянию рчЛФ в экспериментальной модели возрастного гипогонадизма крыс-самцов показал, что уровень общего тестостерона в сыворотке крови контрольной группы 2-летних крыс был достоверно ниже через 1 и 2,5 месяца на 88 и 70,9 % соответственно по отношению к 2-месячным особям (рис. 2, *a*).

Содержание общего тестостерона в сыворотке крови 2-летних крыс спустя 1 и 2,5 месяца потребления рчЛФ достоверно возрастало в 3,4 и 5,1 раза по сравнению с контролем «возрастных» особей. Аналогичные изменения происходили и с уровнем свободного тестостерона в сыворотке

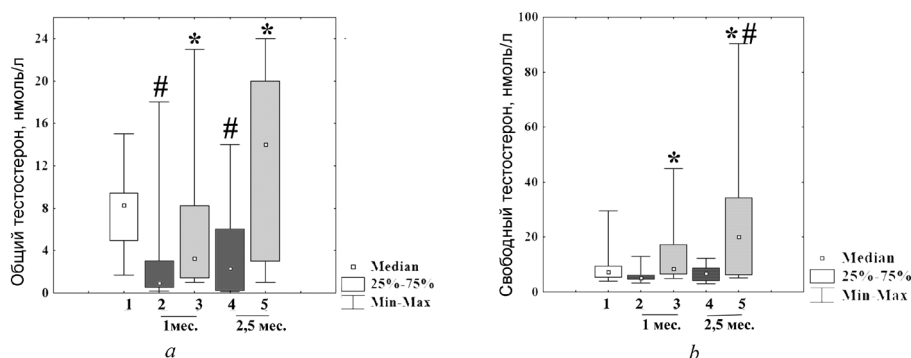


Рис. 2. Уровень общего (а) и свободного тестостерона (б) в сыворотке крови крыс после перорального введения рекомбинантного лактоферрина человека в экспериментальной модели возрастного гипогонадизма: 1 – контрольная группа (2-месячные крысы), 2 и 4 – контрольная группа (2-летние крысы); 3 и 5 – группа (2-летние крысы), получавшие рчЛФ *per os* в концентрации 100 мг/кг на протяжении 1 и 2,5 месяца соответственно; # – достоверные отличия от контрольной группы 2-месячных крыс; * – достоверные отличия от контрольной группы 2-летних крыс ($p < 0,05$, Me 25 %–75 %, $n = 10–14$)

Fig. 2. Level of total (a) and free testosterone (b) in the rat blood serum upon oral administration of human recombinant lactoferrin in the experimental model of age hypogonadism: 1 – control group (2-month rats), 2 and 4 – control group (2-year rats); 3 and 5 – group (2-year rats) taking *per os* human recombinant lactoferrin in a concentration of 100 mg/kg during 1 and 2.5 months, respectively; # – reliable differences from the control group of 2-month rats; * – reliable differences from the control group of 2-year rats ($p < 0.05$, Me 25 %–75 %, $n = 10–14$)

крови. Концентрация анализируемого показателя статистически значимо увеличивалась во всех опытных группах на 61,2 и 119,1 % (3-я и 5-я группы соответственно) по отношению к контрольной группе 2-летних животных, что указывает на возрастающую долю биологически активного андрогена (рис. 2, б). Курсовое кормление рчЛФ на протяжении 2,5 месяца стимулировало значительный рост концентрации свободного тестостерона (на 171,3 %) в сыворотке крови по отношению к молодым особям.

Содержание прогестерона и 17-ОН прогестерона в сыворотке крови 2-летних крыс (4-я группа) значимо снижалось на 60,7 и 21,8 % соответственно по отношению к контрольной группе

Т а б л и ц а 2. Содержание предшественников тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови крыс после перорального введения рекомбинантного лактоферрина человека в экспериментальной модели возрастного гипогонадизма

Table 2. Content of the testosterone and estradiol precursors in the rat blood serum upon oral administration of human recombinant lactoferrin in the experimental model of age hypogonadism

Гормон Hormone	Контроль, 2-месячные крысы (1-я группа) Control, 2-month rats (1 st group)	Экспериментальная модель возрастного гипогонадизма (2-летние крысы) Experimental model of age hypogonadism (2-year rats)			
		через 1 месяц in 1 month		через 2,5 месяца in 2.5 months	
		Контроль (2-я группа) Control (2 nd group)	рчЛФ (100 мг/кг) (3-я группа) Human recombinant lactoferrin (100 mg/kg) (3 rd group)	Контроль (4-я группа) Control (4 th group)	рчЛФ (100 мг/кг) (5-я группа) Human recombinant lactoferrin (100 mg/kg) (5 th group)
Прогестерон, (ммоль/л) Progesterone, nmol/l	7,00 (4,45; 8,60)	3,10 (2,90; 3,70)	3,10 (2,40; 3,95) [#]	2,75 (2,55; 3,60) [#]	2,80 (2,60; 3,70) [#]
17-ОН прогестерон, (ммоль/л) 17-OH progesterone, nmol/l	0,63 (0,57; 0,68)	0,65 (0,53; 0,67)	0,61 (0,43; 0,71)	0,49 (0,34; 0,65) [#]	0,55 (0,50; 0,64)
Эстрадиол, (ммоль/л) Estradiol, nmol/l	0,18 (0,17; 0,18)	0,22 (0,18; 0,23) [#]	0,20 (0,19; 0,24) [#]	0,24 (0,21; 0,27) [#]	0,21 (0,18; 0,24) [#]

П р и м е ч а н и е: # – достоверные отличия от контрольной группы 2-месячных крыс ($p < 0,05$, Me 25 %–75 %, $n = 10–14$).

Note: # – the reliable differences from the control group of 2-month rats ($p < 0.05$, Me 25 %–75 %, $n = 10–14$).

2-месячных крыс (табл. 2), что может происходить из-за уменьшения активности или синтеза соответствующих ферментов метаболического пути образования тестостерона (3 β -гидроксистероиддегидрогеназы и 17 α -гидроксилазы соответственно) в клетках Лейдига с возрастом [7].

После курсового потребления рчЛФ 2-летними особями, не было обнаружено существенных изменений содержания прогестерона и 17-ОН прогестерона в сыворотке крови. Концентрация эстрадиола в сыворотке крови значимо возрастала во всех контрольных группах на 24,7 и 36 % (2-я и 4-я группы соответственно) по сравнению с молодыми особями. Указанные изменения, возможно, связаны с возрастным увеличением активности или синтеза ароматазы, которая конвертирует тестостерон в эстрадиол. При анализе уровня эстрадиола в сыворотке крови экспериментальных животных после 1 и 2,5 месяца перорального введения рчЛФ, показано, что данный показатель имел тенденцию к снижению на 9,1 и 14,6 % соответственно по отношению к контрольной группе 2-летних крыс.

Заключение. Показано, что после завершения курсового введения рекомбинантного лактоферрина человека молодым крысам (2 мес.) уровень тестостерона оставался повышенным ($p < 0,05$) в течение семи недель, постепенно возвращаясь до значений контрольной группы без угнетения эндогенного биосинтеза. При этом наблюдалось восстановление уровня эстрадиола в сыворотке крови до контрольных показателей уже на первой неделе.

В модели возрастного гипогонадизма системное введение *per os* рекомбинантного лактоферрина человека экспериментальным животным оказывало значительное стимулирующее действие на биосинтез тестостерона у 2-летних особей, нормализуя его уровень до физиологических значений молодых крыс.

Таким образом, впервые показана возможность нормализации рекомбинантным лактоферрином человека гормональных изменений, связанных с возрастным андрогенным дефицитом. Это является принципиальным отличием от существующих препаратов для коррекции данной патологии на основе андрогенов (как натуральных, так и синтетических), после приема которых происходит подавление синтеза эндогенного тестостерона.

Зарегистрированные эффекты изучаемого трансферрина являются основанием для проведения дальнейших экспериментальных исследований с целью выяснения механизмов действия лактоферрина, его возможного использования не только для коррекции андрогенного дефицита при возрастном гипогонадизме, но и при других патологиях, связанных с нарушением стероидогенеза.

Список использованных источников

1. Effects of long-term androgen replacement therapy on the physical and mental statuses of aging males with late-onset hypogonadism: a multicenter randomized controlled trial in Japan (EARTH Study) / H. Konaka [et al.] // *Asian J. Androl.* – 2016. – Vol. 18, N 1. – P. 25–34. doi.org/10.4103/1008-682x.148720.
2. Selective androgen receptor modulators for the treatment of late onset male hypogonadism / C. C. Coss [et al.] // *Asian J. Androl.* – 2014. – Vol. 16, N 2. – P. 256–261. doi.org/10.4103/1008-682x.122339.
3. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
4. Lactoferrin from Milk: Nutraceuical and Pharmacological Properties / F. Giansanti [et al.] // *Pharmaceuticals.* – 2016. – Vol. 9, N 4. – P. 61. doi.org/10.3390/ph9040061.
5. Рудниченко, Ю. А. Влияние человеческого лактоферрина на уровень тестостерона в гипоталамо-гипофизарно-гонадной системе крыс / Ю. А. Рудниченко // Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2015. – № 2. – С. 102–104.
6. Rat's age versus human's age: what is the relationship? / N. A. Andreollo [et al.] // *Arq. Bras. Cir. Dig.* – 2012. – Vol. 25, N 1. – P. 49–51. doi.org/10.1590/s0102-67202012000100011.
7. Chen, H. Leydig cells: From stem cells to aging / H. Chen, R. S. Ge, B. R. Zirkin // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 306, N 1–2. – P. 9–16. doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.023.

References

1. Konaka H., Sugimoto K., Orikasa H., Iwamoto T., Takamura T., Takeda Y., Shigehara K., Iijima M., Koh E., Namiaki M. Effects of long-term androgen replacement therapy on the physical and mental statuses of aging males with late-onset hypogonadism: a multicenter randomized controlled trial in Japan (EARTH Study). *Asian Journal of Andrology*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 25–34. doi.org/10.4103/1008-682x.148720.

2. Coss C. C., Jones A., Hancock M. L., Steiner M. S., Dalton J. T. Selective androgen receptor modulators for the treatment of late onset male hypogonadism. *Asian Journal of Andrology*, 2014, vol. 16, no. 2, pp. 256–261. doi.org/10.4103/1008-682x.122339.

3. Lukashevich V. S., Budevich A. I., Semak I. V., Kuznetsova V. N., Malyushkova E. V., Pyzh A. E., Novakovskaya S. A., Rudnichenko Yu. A., Popkov N. A., Ivashkevich O. A., Zalutsky I. V. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72–81 (in Russian).

4. Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*, 2016, vol. 9, no. 4, pp. 61. doi.org/10.3390/ph9040061.

5. Rudnichenko Ju. Impact of human lactoferrin on the testosterone level in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis rats. *Vestsi Natsyional'nei akademii navuk Belarusi. Seryia medytsynskikh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series], 2015, no. 2, pp. 102–104 (in Russian).

6. Andreollo N. A., dos Santos E. F., Araújo M. R., Lopes L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 2012, vol. 25, no. 1, pp. 49–51. doi.org/10.1590/s0102-67202012000100011.

7. Chen H., Ge R. S., Zirkin B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, vol. 306, no. 1–2, pp. 9–16. doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.023.

Информация об авторах

Рудниченко Юлия Анатольевна – мл. науч. сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: link060619@list.ru.

Лукашевич Владимир Сергеевич – ст. науч. сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lukashvs@rambler.ru.

Залуцкий Иосиф Викторович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: IZalutsky@gmail.com.

Для цитирования

Рудниченко, Ю. А. Влияние рекомбинантного лактоферрина человека на уровень половых гормонов у самцов крыс разного возраста / Ю. А. Рудниченко, В. С. Лукашевич, И. В. Залуцкий // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 2. – С. 58–63.

Information about the authors

Rudnichenko Julia Anatolievna – Junior researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: link060619@list.ru.

Lukashevich Vladimir Sergeevich – Senior researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lukashvs@rambler.ru.

Zalutsky Iosiph Victorovich – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Director, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: IZalutsky@gmail.com.

For citation

Rudnichenko Ju. A., Lukashevich U. S., Zalutsky I. V. Influence of human recombinant lactoferrin on the level of sex hormones in male rats of different age. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2017, vol. 61, no. 2, pp. 58–63 (in Russian).