

## **Влияние лактоферрина из молозива коров на интенсивность перекисных процессов в фрагментах печени при их гипотермическом хранении**

Б.П. САНДОМИРСКИЙ, С.Е. ГАЛЬЧЕНКО, Е.С. ГАЛЬЧЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## **Effect of Lactoferrin Derived From Bovine Colostrum on the Intensity of Peroxidative Processes in Liver Fragments under their Hypothermic Storage**

SANDOMIRSKY B.P., GALCHENKO S.E., GALCHENKO E.S.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Изучалась антиоксидантная (АО) активность железо-связывающего белка лактоферрина (ЛФ) из нативного и лиофилизированного молозива коров на модели гипотермического хранения фрагментов печени крыс. При оценке перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые интенсифицируются в мембранах при холодовом хранении фрагментов, показано, что ЛФ как из нативного, так и лиофилизированного молозива оказывает выраженное АО действие и замедляет истощение эндогенных систем АО защиты.

У роботі вивчалась антиоксидантна активність залізов'язуючого білка лактоферину з нативного і ліофілізованого молозива корів на моделі гіпотермічного зберігання фрагментів печінки щурів. При оцінці перекисного окислення ліпідів, які інтенсифікуються у мембранах при холодовому зберіганні фрагментів, показано, що лактоферин як із нативного, так і ліофілізованого молозива має виражену антиоксидантну дію і уповільнює виснаження ендогенних систем антиоксидантного захисту.

The antioxidative (AO) activity of iron-binding protein lactoferrin (LF) derived from native and lyophilized bovine colostrum in the model of hypothermic storage of rat liver fragments has been studied. While estimating the lipid peroxidation (LPO) intensifying in membranes during cold storage of fragments, it has been shown that lactoferrin both from native and lyophilized colostrum has strong antioxidative effect and slows down the exhaustion of endogenous systems of antioxidative protection.

Процесс жизнедеятельности клеток и тканей сопровождается ПОЛ, при котором образуются продукты, влияющие на физиологическое и структурное состояние клеток. В норме эти процессы находятся под контролем АО систем, но при некоторых патологических состояниях возможна активация ПОЛ. Важным результатом ПОЛ является образование в системе свободных радикалов, промежуточных (диеновые конъюгаты) и конечных продуктов (малоновый диальдегид, эпоксиды и близкие к ним соединения), которые негативно влияют на структуру и состав фосфолипидов, а также могут приводить к повреждениям белков и нуклеиновых кислот [2].

Активными катализаторами процессов ПОЛ являются ионы металлов переменной валентности (Fe, Cu, Mn, Co), из них наиболее выраженный Fe<sup>2+</sup>. Ионы Fe<sup>2+</sup> непосредственно окисляются молекулярным O<sub>2</sub>, формируя радикалы H<sub>2</sub>O<sup>•</sup>, способные индуцировать ПОЛ и реагировать с гидроперекисями. В последнем случае также формируются свободные радикалы, инициирующие новые цепи окисления. Ускорение ПОЛ может происходить и в результате уменьшения резервов АО. Дефект в какой-либо цепи АО защиты приводит к активации ПОЛ. Один из возможных путей АО защиты на этапе индукции ПОЛ состоит в удалении ионов металлов переменной валентности из гидрофобной фазы

The process of cells and tissues vital activity is accompanied with LPO, when there have formed the products significantly affecting physiological, metabolic and structural cell state. In the norm these processes are under the control of antioxidative systems (AS), however under some pathological states the LPO activation is possible. Formation in the system of free radicals, intermediate (diene conjugates) and final products (malone dialdehyde, epoxides and close to them compounds), negatively affecting the structure and composition of phospholipids and may cause the protein and nucleic acid damages, has been an important LPO result [2].

Metal ions of an alternating valency (Fe, Cu, Mn, Co) are active catalysers of LPO processes, among which Fe<sup>2+</sup> is the most manifested. Fe<sup>2+</sup> ions are directly oxidised by molecular O<sub>2</sub> by forming H<sub>2</sub>O<sup>•</sup> radicals, capable of LPO induction and reaction with hydrogen peroxides. In the latter case free radicals, initiating new oxidation chains, have been also formed. LPO acceleration may also occur in the result of the reduction of AO stocks. The effect in any of the chains of antioxidative protection causes the LPO activation. One of the possible ways of AO protection at the stage of LPO induction consists in the removal of metal ions of alternating valency out of the membrane hydrophobic phase and extracellular medium by means of chelators. Lactoferrin (LF), that is a protein fraction of cow milk can be such a chelator, especially its high content is noted in colostrum [7]. It

мембран и из внеклеточной среды с помощью хелаторов. Таким хелатором может выступать ЛФ – белковая фракция коровьего молока, особенно его большое содержание отмечается в молозиве [7]. Он обладает рядом функциональных свойств, способен связывать и транспортировать  $Fe^{2+}$  [4, 6]. Роль ЛФ в механизме действия АО защиты исследована недостаточно.

Адекватной моделью изучения влияния ЛФ из молозива коров на биологические объекты может быть модель гипотермического хранения фрагментов печени крыс. Цель работы – изучение влияния ЛФ из нативного и лиофилизированного молозива коров на интенсивность перекисных процессов в фрагментах печени в условиях гипотермического хранения.

В работе использовали молозиво коров 2-3-х суток лактации. Молозиво замораживали и хранили в жидком азоте. Лиофилизацию проводили на установке УЗВ-10. Регидратацию молозива осуществляли дистиллированной водой.

Получали ЛФ по методу [5]. Молозиво центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин на центрифуге ОПн-3. Полученную плазму подкисляли раствором HCl до pH 4,6 и центрифугированием разделяли на препарат казеина и сыворотку. Из сыворотки после подщелачивания NaOH до pH 8,0 сульфатом аммония (в области от 30 до 80 % насыщения) осаждали фракцию белков, которая содержит ЛФ. Осадок растворяли в воде и раствор подкисляли до pH 4,0 для осаждения  $\alpha$ -лактальбумина в изоэлектрической точке. Раствор центрифугировали, отбирали надосадок и его pH доводили до 7,0. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [8].

Фрагменты печени крыс получали продавливанием ее через решетку с диаметром отверстий 0,8 мм, трижды отмывали средой 199 и исследовали после 30 мин (контроль), 24, 48 и 72 ч хранения при температуре 4°C в той же среде. В опытных пробах среда дополнительно содержала 5 мг/мл ЛФ. Для определения уровня ПОЛ фрагменты печени крыс гомогенизировали в 100 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4) и фильтровали через нейлоновую ткань. Соотношение навески ткани и объема среды гомогенизации 1:3. Уровень спонтанного,  $Fe^{2+}$ - и аскорбат-индуцированного ПОЛ в гомогенате определяли по скорости накопления активных продуктов тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП), т.е. продуктов, реагирующих с ней, согласно методу [3]. При спонтанном ПОЛ среда инкубации содержала 100 ммоль трис-HCl буфера (pH 7,4) и 2,5 мл исследуемого гомогената, при индуцированном ПОЛ – дополнительно 0,5 ммоль аскорбата или 12 мкмоль соли Мора. Реакцию проводили на водяной бане при температуре 37°C в течение 15 мин.

Хемилюминесцентный (ХЛ) анализ выполняли на хемилюминометре, работающем в режиме счета фотонов. В ячейку хемилюминометра, содержащую 1 мл физиологического раствора (pH 7,4) и 100 мкл

possesses the series of functional properties, capable of  $Fe^{2+}$  binding and transporting [4, 6]. Lactoferrin role in the effect mechanism of AO protection has been insufficiently studied.

The model for rat liver fragments' hypothermic storage can be an adequate model for studying the effect of lactoferrin, derived from bovine colostrum, on biological objects.

The aim of given work was to study the effect of LF derived from native and lyophilised bovine colostrum, on the intensity of peroxidative processes in liver fragments under the conditions of hypothermic storage.

Bovine colostrum of 2-3 days of lactation was used in the work. Colostrum was frozen and stored under liquid nitrogen. Lyophilisation was done by means of UZV-10 device. Colostrum rehydration was accomplished by distilled water.

LF was obtained according to the method [5]. Colostrum was centrifuged within 15 min under 3000 rot/min by means of OPn-3 centrifuge. Obtained plasm was acidified by HCl solution up to pH 4,6 and sedimented on casein and serum.

Protein fraction containing lactoferrin, was sedimented out of serum following NaOH alkalization by ammonium sulphate up to 8,0 (within the range from 30 to 80% saturation). Sediment was dissolved in a water and solution was acidified up to pH 4,0 for  $\alpha$ -lactate albumin sedimentation in isoelectric point. Solution was centrifuged, sediment was removed and its pH was approached to 7.0. Protein concentration was determined according to the Lowry method [8].

Rat liver fragments were obtained by means of liver pressing through a lattice with the holes diameter of 0.8 mm, three times washing-out by the 199 medium and studied in 30 min (the control), 24, 48 and 72hrs of storage under the temperature of 4°C in the same medium. In the experimental samples the medium additionally comprised 5mg/ml of LF. To determine the LPO level rat liver fragments were homogenised in 100 mM tris-HCl buffer (pH 7.4) and filtered through a nylon tissue. The ratio of tissue and the volume of homogenisation medium made 1:3. The level of spontaneous,  $Fe^{2+}$ - and ascorbate-induced LPO in homogenate was detected by the accumulation rate of TBA-active products (TBAAP), i.e. the products, reacting with thiobarbituric acid, according to the method [3]. During spontaneous LPO the incubation medium comprised 100 mM tris-HCl-buffer (pH 7.4) and 2.5 ml of studied homogenate, at induced LPO it additionally contained 0.5 mM ascorbate or 12  $\mu$ M of Mour's salt. Reaction was accomplished in water bath under the temperature of 37°C within 15 min.

Chemiluminescence (Chl) analysis was done in chemiluminometer, working in the regimen of photon calculation. Into a chemiluminometer cell, containing 1 ml of physiological solution (pH 7.4) and 100  $\mu$ l of rat liver homogenate fragments we have added 100  $\mu$ l of Mour's salt in final concentration of  $5 \times 10^{-2}$  M or 100  $\mu$ l 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and light sum of chemiluminescence in relative units was recorded within 10 and 60 s, correspondingly [1].

гомогената фрагментов печени крыс, добавляли 100 мкл раствора соли Мора в конечной концентрации  $5 \times 10^{-2}$  моль или 100 мкл 5%-й  $H_2O_2$ , светосумму ХЛ регистрировали в течение 10 и 60 с соответственно и выражали в условных единицах [1].

Наиболее чувствительным методом определения свободнорадикальных интермедиатов является метод, основанный на измерении интенсивности ХЛ электронно-возбужденных продуктов, которые образуются при рекомбинации свободных радикалов. По сути это косвенный метод регистрации липидных радикалов, так как позволяет определить не сами радикалы, а те из молекулярных продуктов, которые оказываются в возбужденном состоянии при их рекомбинации.

В табл. 1 представлены данные по интенсивности ХЛ модельной системы, индуцированной  $Fe^{2+}$ , в зависимости от срока гипотермического хранения фрагментов печени, а также наличия или отсутствия ЛФ из нативного и лиофилизированного молозива коров в среде хранения.

При хранении фрагментов в среде без ЛФ интенсивность ХЛ, индуцированной  $Fe^{2+}$ , а следовательно, и количество свободных радикалов достоверно выше контроля уже через 24 ч. При наличии в среде хранения ЛФ как из нативного, так и лиофилизированного молозива различия по сравнению с контролем наблюдаются только к 72-м часам хранения. При этом различия в интенсивности ХЛ фрагментов, хранившихся в среде с ЛФ, становятся достоверными уже через 24 ч хранения. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что ЛФ, введенный в среду хранения, препятствует образованию свободных радикалов в фрагментах печени при всех изученных сроках хранения. При этом ЛФ снижает интенсивность ХЛ в 2,4 и 1,6 раза к 48 и 72 часам хранения соответственно.

Интенсивность ХЛ, индуцированной перекисью водорода, отражает устойчивость биологического объекта к перекисному окислению, которая зависит от многих факторов, в том числе от структурной организации биологических мембран, количества ненасыщенных жирных кислот и АО биоэнергетики клеток и т.д.

Как видно из табл. 2, интенсивность ХЛ, а следовательно, и устойчивость фрагментов печени к перекисному окислению даже при хранении без ЛФ отличается от контроля через 48 ч хранения, в то время как интенсивность ХЛ, индуцированной  $Fe^{2+}$ , к 24-м часам хранения. Можно предположить, что АО системы, обезвреживающие свободные радикалы и перекиси, сохраняют свою активность до 24-х часов хранения, а затем наблюдается их истощение, что и приводит к резкому росту ХЛ к 48

**Таблица 1.** Интенсивность ХЛ (усл.ед.), индуцированной  $Fe^{2+}$ , в зависимости от источника ЛФ и срока гипотермического хранения фрагментов печени крыс

**Table 1.** Chemiluminescence intensity (relative units), induced by  $Fe^{2+}$ , depending on the LF source and term of rat liver fragments' hypothermic storage

Время хранения, ч Term of storage, hrs	Без ЛФ Without LF	Источник ЛФ LF source	
		Нативное молозиво Native colostrum	Леофилизированное молозиво Lyophilised colostrum
Контроль 0,5 The control 0,5	1887±185	1731±163	1899±171
24	2672±228 <sup>1</sup>	1795±161 <sup>2</sup>	1884±185 <sup>2</sup>
48	4881±439 <sup>1</sup>	2031±192 <sup>2</sup>	1990±168 <sup>2</sup>
72	8713±801 <sup>1</sup>	5681±691 <sup>1,2</sup>	5539±709 <sup>1,2</sup>

**Примечания:** <sup>1</sup>—различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup>—различия достоверны по сравнению с тем же сроком хранения без ЛФ,  $p < 0,05$ .

**Notes:** <sup>1</sup> – differences are significant comparing to the control,  $p < 0.05$ ; <sup>2</sup> – differences are significant comparing to the same term of storage without LF,  $p < 0.05$ .

The most susceptible method for the determination of free radical intermediates is the method, based on the measuring the chemiluminescence intensity in electronically-excited products, formed during free radical recombination. In point of fact, this is an indirect method for lipid radicals registration, because it allows to determine not radicals themselves, but those molecular products, which occurred to be at excited state during their recombination.

In the Table 1 there are the data on the ChL intensity of modelling system, induced by  $Fe^{2+}$ , depending on the term of liver fragment hypothermic storage, as well as the presence or absence of LF, derived from native or lyophilised bovine colostrum in the storage medium.

During the fragments storage in the medium without LF, the ChL intensity, induced by  $Fe^{2+}$ , and consequently, the amount of free radicals are significantly higher than the control already by 24hrs. When LF derived both from native and lyophilised colostrum is present in the storage medium, the differences comparing to the control are observed only by 72 hrs' storage. Thereat the differences in the ChL intensity of the fragments, stored in the LF-comprised medium, were considerable by 24-hrs' storage. Thus, the data presented testify to the fact that LF, introduced into the storage medium, prevents the formation of free radicals in liver fragments in all studied terms of storage. Thereat LF reduces the ChL intensity by 2,4 and 1,6 times in 48 and 72-hrs of storage, correspondingly.

Chemiluminescence intensity, induced by hydrogen peroxide, has reflected the biological object resistance to peroxidation, which depends on many factors, and structural organisation of biological membranes as well, the amount of non-saturated fatty acids and АО of cell bioenergetics etc.

As the Table 2 shows, the chemiluminescence intensity, and consequently, the resistance of liver

**Таблица 2.** Интенсивность ХЛ (усл. ед.  $\times 10^2$ ), индуцированной  $H_2O_2$ , в зависимости от источника ЛФ и срока гипотермического хранения фрагментов печени крыс.

**Table 2.** Chemiluminescence intensity (relative units  $\times 10^2$ ), induced by  $H_2O_2$ , depending on the LF source and term of rat liver fragments' hypothermic storage

Время хранения, ч Term of storage, hrs	Без ЛФ Without LF	Источник ЛФ LF source	
		Нативное молозиво Native colostrum	Лиофилизированное молозиво Lyophilised colostrum
Контроль 0,5 The control 0,5	1872 $\pm$ 153	1732 $\pm$ 179	1923 $\pm$ 161
24	2275 $\pm$ 213	1894 $\pm$ 181	2036 $\pm$ 175
48	6485 $\pm$ 584 <sup>1</sup>	1993 $\pm$ 142 <sup>2</sup>	2125 $\pm$ 183 <sup>2</sup>
72	11926 $\pm$ 1113 <sup>1</sup>	5721 $\pm$ 521 <sup>1,2</sup>	5644 $\pm$ 548 <sup>1,2</sup>

**Примечания:** <sup>1</sup>–различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ;  
<sup>2</sup>–различия достоверны по сравнению с тем же сроком хранения без ЛФ,  $p < 0,05$ .

**Notes:** <sup>1</sup> – differences are significant comparing to the control,  $p < 0.05$ ;  
<sup>2</sup> – differences are significant comparing to the same term of storage without LF,  $p < 0.05$ .

и особенно к 72-м часам хранения. Если в среде хранения содержится ЛФ, интенсивность ХЛ достоверно отличается от контроля только к 72-м часам хранения, но в этом случае она ниже ХЛ гомогената фрагментов, хранившихся без ЛФ. Если интенсивность ХЛ биоматериала, хранившегося без ЛФ, увеличивается в 6,4 раза, то при хранении с ЛФ – в 3,3 раза.

Полученные данные свидетельствуют, что железосвязывающие свойства ЛФ являются эффективным АО, препятствующим инициации процессов ПОЛ, и при этом устойчивость биологических объектов к перекисному окислению остается неизменной длительное время, что может быть связано с меньшей нагрузкой на эндогенные АО системы.

Если результаты, приведенные в табл.1, характеризуют начальные этапы ПОЛ в биологических объектах, то уровень ТБААП позволяет определить количество конечных продуктов этого процесса.

При изучении влияния ЛФ из нативного и лиофилизированного молозива коров на уровень образования ТБААП в фрагментах печени крыс в зависимости от срока гипотермического хранения были получены результаты, приведенные в табл.3. Через 2-е суток гипотермического хранения фрагментов без ЛФ отмечалось более чем в два раза увеличение количества ТБААП, что свидетельствует об интенсификации перекисных процессов в мембранах клеток. Наличие в среде ЛФ из нативного молозива способствует подавлению накопления конечного продукта ПОЛ до 48 ч хранения. Подобный эффект ингибирования образования ТБААП получен и при

fragments to lipid peroxidation during the storage without LF differ from the control by 48 hrs of storage, while the ChL intensity, induced by  $Fe^{2+}$ , differs from the control by 24 hrs of storage. It may be supposed that AO systems rendering harmless free radicals and peroxides, keep their activity up to 24 hrs of storage, and then their exhausting is observed, that results in a sharp growth of ChL by 48 hrs, and especially, by 72 hrs of storage. When a storage medium contains LF, the ChL intensity significantly differs from the control only by 72 hrs of storage, but even in this case it is lower than ChL of fragment homogenate, stored without LF. While the ChL intensity of the biomaterial stored without LF, increases by 6.4 times, in the case of storage with LF this index rises by 3.3 times.

The data obtained testify to the fact that iron-binding LF property is an efficient AO, preventing the initiation of LPO processes, and therefore the resistance of biological objects to peroxidation has remained unchangeable for a long time, that may be related to lesser loading to endogenous AO systems.

While the results, given in the Table 1, characterise the initial LPO stages in biological objects, the level of TBAAP allows to determine the amount of final products of this process.

When studying the effect of LF derived from native and lyophilised bovine colostrum at the level of TBAAP forming in rat liver fragments depending on the term of hypothermic storage, the results, presented in the Table 3, have been obtained. In 2 days of the fragments' hypothermic storage without LF, more than twice TBAAP increase was noted, that testified to the intensification of peroxidative processes in cell membranes. The presence in the medium of LF derived

**Таблица 3.** Влияние ЛФ на уровень образования ТБААП (нмоль/г ткани) в фрагментах печени крыс при их гипотермическом хранении

**Table 3.** The effect of LF on the level of TBAAP forming (nmol/g of tissue) in rat liver fragments under their hypothermic storage

Время хранения, ч Term of storage, hrs	Без ЛФ Without LF	Источник ЛФ LF source	
		Нативное молозиво Native colostrum	Лиофилизированное молозиво Lyophilised colostrum
Контроль 0,5 The control 0,5	5,1 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,4
24	5,8 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,4
48	10,9 $\pm$ 0,7 <sup>1</sup>	5,9 $\pm$ 0,4 <sup>2</sup>	5,7 $\pm$ 0,5 <sup>2</sup>
72	12,4 $\pm$ 0,9 <sup>1</sup>	11,1 $\pm$ 0,8 <sup>1,2</sup>	11,8 $\pm$ 1,0 <sup>1,2</sup>

**Примечания.** <sup>1</sup>–различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ;  
<sup>2</sup>–различия достоверны по сравнению с тем же сроком хранения без ЛФ,  $p < 0,05$ .

**Notes:** <sup>1</sup> – differences are significant comparing to the control,  $p < 0.05$ ;  
<sup>2</sup> – differences are significant comparing to the same term of storage without LF,  $p < 0.05$ .

использовании ЛФ из лиофилизированного молозива.

Для подтверждения противooksидительного механизма действия ЛФ было изучено образование ТБКАП в экспериментальных условиях, указанных в табл.4. Полученные данные свидетельствуют о том, что ЛФ снижает уровень как  $Fe^{2+}$ , так и аскорбат-индуцированного образования конечных продуктов ПОЛ. Это может быть объяснено только

**Таблица 4.** Влияние ЛФ на спонтанное,  $Fe^{2+}$ - и аскорбат-индуцированное образование ТБКАП (нмоль/г ткани) в фрагментах печени при их гипотермическом хранении

**Table 4.** LF effect on the spontaneous,  $Fe^{2+}$ - and ascorbate-induced TBAAP forming (nMol/g of tissue) in liver fragments under their hypothermic storage

Среда хранения Storage medium	Образование ТБКАП TBAAP forming	Время хранения, ч Term of storage, hrs		
		Контроль 0,5 Control 0,5	24	48
Без ЛФ Without LF	Спонтанное Spontaneous	4,9±0,2	8,8±0,6 <sup>1</sup>	15,1±1,1 <sup>1</sup>
	$Fe^{2+}$ -индуцированное $Fe^{2+}$ induced	5,9±0,3	10,1±0,7 <sup>1</sup>	21,7±1,9 <sup>1</sup>
	Аскорбат-индуцированное Ascorbate-induced	10,2±0,6	14,4±0,9 <sup>1</sup>	32,0±2,5 <sup>1</sup>
В присутствии ЛФ In the LF presence	Спонтанное Spontaneous	5,2±0,3	5,8±0,3 <sup>2</sup>	9,4±0,7 <sup>1,2</sup>
	$Fe^{2+}$ -индуцированное $Fe^{2+}$ - induced	5,6±0,4	6,2±0,4 <sup>2</sup>	13,3±1,2 <sup>1,2</sup>
	Аскорбат-индуцированное Ascorbate-induced	9,9±0,4	8,2±0,6 <sup>1,2</sup>	18,9±1,5 <sup>1,2</sup>

**Примечания.** <sup>1</sup> – различия достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ ;

<sup>2</sup> – различия достоверны по сравнению с тем же сроком хранения без ЛФ,  $p < 0,05$ .

**Notes:** <sup>1</sup> – differences are significant comparing to the control,  $p < 0,05$ ;

<sup>2</sup> – differences are significant comparing to the same term of storage without LF,  $p < 0,05$ .

тем, что ЛФ уменьшает эффективную концентрацию  $Fe^{2+}$ , тем самым снижая активацию процессов ПОЛ на этапе образования свободных радикалов и разветвления цепей пероксидации. Меньший уровень аскорбат-индуцированной пероксидации в присутствии ЛФ также подтверждает, что в этом случае меньшее количество  $Fe^{2+}$  доступно для восстановления аскорбатом.

Следовательно, полученные данные свидетельствуют о наличии у ЛФ антиooksидительных свойств, что связано, по-видимому, с его хелаторными способностями по отношению к  $Fe^{2+}$ . Проведенные исследования показывают, что ЛФ как из лиофилизированного, так и нативного молозива коров в равной степени обладает АО свойствами.

Увеличение интенсивности пероксидации липидов в процессе гипотермического хранения в присутствии ЛФ может быть объяснено уменьшением его количества из-за вовлечения в процессы метаболизма или исчерпанием его хелаторной емкости

from native colostrum promotes to the suppression of the LPO final product accumulation up to 48 hrs. Such an inhibiting effect of the TBAAP formation was also achieved when using LF derived from lyophilised colostrum.

To confirm antioxidative mechanism of the LF effect we have studied the TBAAP forming under experimental conditions, noted in the Table 4. Obtained data testify, that LF reduces the level of both  $Fe^{2+}$  and ascorbate-induced formation of final LPO products. This may be explained only by the fact that LF reduces an efficient  $Fe^{2+}$  concentration, decreasing the activation of LPO processes at the stage of free radicals forming and branching of peroxidation chains. Lesser level of ascorbate-induced peroxidation in the LF presence has also confirmed, that in this case the amount of  $Fe^{2+}$  is accessible to be recovered by ascorbate. Therefore obtained data confirm the presence of antioxidative properties in LF, that is, obviously, related to its chelatory characteristics in respect of  $Fe^{2+}$ . Carried-out investigations have demonstrated, that both lyophilised and native LF derived from bovine colostrum in an equal value possessed AO properties.

Augmentation of the intensity of lipid peroxidation during the process of hypothermic storage in the LF presence may be explained by the reduction of its amount owing to the involvement into the metabolism processes or exhausting of its chelatory capacity (one molecule of LF is capable of binding with  $Fe^{2+}$  ions). The reduction of endogenous antioxidants in a tissue is also possible. To reveal the most probable cause of the mentioned above phenomenon we have added LF in 5mg/ml final concentration into the incubation medium after 24hrs of hypothermic storage. LPO characteristics under this condition are given in the Table 5.

According to the data presented, it has been seen, that additional introduction of LF into the storage medium did not prevent the development of LPO processes comparing to first 48 hrs of storage, but considerably delayed both the TBAAP accumulation in tissue and an increase of ChL intensity up to 96 hrs of storage.

Thus, according to the results obtained it may be concluded the following: LF derived from bovine colostrum shows manifested AO effect under hypothermic storage of rat liver fragments. During the storage of tissue fragments the LF protective effect decreases, but can be partially compensated by its additional introduction. The presence of LF in a storage medium slows down the exhaustion of endogenous systems of AO protection. Colostrum lyophilisation does not decrease AO properties of LF, being its component.

(одна молекула ЛФ способна связать два иона Fe<sup>2+</sup>). Возможно также уменьшение эндогенных АО в ткани. Для выяснения наиболее вероятной причины указанного выше явления в среду инкубации после 24-х часов гипотермического хранения был добавлен ЛФ в конечной концентрации 5 мг/мл. Характеристики ПОЛ при этом условии приведены в табл. 5.

Из представленных данных видно, что дополнительное введение в среду хранения ЛФ, хотя и не предотвращает развитие процессов ПОЛ, как в первые 48 ч хранения, но достоверно замедляет как накопление ТБКАП в ткани, так и увеличение интенсивности ХЛ до 96 ч хранения.

Таким образом, из полученных результатов можно сделать следующие выводы: ЛФ из молозива коров оказывает выраженное АО действие при гипотермическом хранении фрагментов печени крыс. Во время хранения фрагментов ткани защитное действие ЛФ снижается, но может быть в некоторой степени компенсировано дополнительным его введением. Наличие ЛФ в среде хранения замедляет истощение эндогенных систем АО защиты. Лиофилизация молозива не снижает АО свойств входящего в его состав ЛФ.

### Литература

1. Белизи С., Назарова И.А., Климова И.А. и др. Антиоксидантные свойства лактоферрина из женского молока // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1999. – №5. – С. 523-525.
2. Белоус А.М., Конник К.Т. Физиологическая роль железа. – Киев: Наук.думка, 1991. – 104 с.
3. Овсянников С.Е., Никитченко Ю.В., Мазалов В.К., Луговой В.И. Перекисное окисление липидов в динамике самоотогрева после острого охлаждения организма крыс // Пробл. криобиологии. – 1996. – №1. – С. 37-40.
4. Сухарев А.Е. Лактоферрин, его свойства и значение в патологии // Патологическая физиология и эксп. терапия. – 1992. – №3. – С.55-58.
5. Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Коханова И.Д. и др. Лактоферрин человека: получение высокоочищенных препаратов из молока женщин, некоторые физико-химические свойства и распределение в нормальных и опухолевых тканях // Вопр. мед. химии. – 1986. – 32, №6. – С. 75-79.
6. Baveye S., Ellass E., Mazurier J. et al. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process // Clin. Chem. Lab. Med. – 1999. – №37. – P. 281-286.
7. Lonnerdal B., Iyers S. Lactoferrin: molecular structure and biological function // Annu. Rev. Nutr. – 1995. – №5. – P. 93-100.
8. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P. 265-275.

Поступила 09.04.2002

**Таблица 5.** Влияние дополнительного введения ЛФ в среду после 24-х часов гипотермического хранения фрагментов печени на показатели перекисного окисления

**Table 5.** Effect of additional LF introduction into the medium in 24 hrs of liver fragments' hypothermic storage on the peroxidation indices

Условия эксперимента Experiment conditions	Время хранения, ч Term of storage, hrs	Исследуемый показатель Studied index		
		ХЛ, индуцированная Fe <sup>2+</sup> , усл.ед. Fe <sup>2+</sup> -induced ChL, rel.units	ХЛ, индуцированная H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , усл.ед.×10 <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced ChL, rel. Units ×10 <sup>2</sup>	Уровень ТБКАП ТВААP level
Контроль без ЛФ Control without LF	48	5123±527	6971±608	10,3±0,7
	72	9432±832	13129±1185	12,9±0,9
	96	11242±1185	19785±1913	15,7±1,1
Без дополнительного введения ЛФ Without additional LF introduction	48	1913±165	2121±198	6,2±0,5
	72	5721±408	8218±829	10,8±0,7
	96	11127±1396 <sup>1</sup>	18135±1518 <sup>1</sup>	13,1±1,2 <sup>1</sup>
Дополнительное введение ЛФ Additional LF introduction	48	2075±199	2325±207	5,3±0,6
	72	4131±451 <sup>2</sup>	2979±263 <sup>2</sup>	7,0±0,8 <sup>2</sup>
	96	7993±863 <sup>2</sup>	6987±651 <sup>2</sup>	9,3±0,7 <sup>2</sup>

**Примечания:** <sup>1</sup> – различия недостоверны по сравнению с контролем, p>0,05;

<sup>2</sup> – различия достоверны по сравнению с хранением без дополнительного введения без ЛФ, p<0,05.

**Notes:**

<sup>1</sup> – differences are insignificant comparing to the control, p>0.05;

<sup>2</sup> – differences are significant comparing to the storage without additional injection of LF, p<0.05.

### References

1. Belizi S., Nazarova I.A., Klimova I.A. et al. Antioxidative properties of lactoferrin derived from women's milk // Bul. Experim. Biol. and Med. – 1999. – N5. – P. 523-525.
2. Belous A.M., Konnik K.T. Physiological role of iron. – Kiev: Nauk.dumka, 1991. – 104p.
3. Ovsyannikov S.E., Nikitchenko Yu.V., Mazalov V.K., Lugovoj V.I. Lipid peroxidation in the dynamics of self-warming after a sharp cooling of rat organism // Problems of Cryobiology. – 1996. – N1. – P. 37-40.
4. Sukharev A.E. Lactoferrin, its properties and value in a pathology // Pathological Physiology and Experim. Therapy. – 1992. – N3. – P. 55-58.
5. Yakubovskaya R.I., Nemtsova E.R., Kohanova I.D. et al. Human lactoferrin: obtaining of highly purified preparations derived from women's milk, some physical and chemical properties and distribution in normal and tumor tissues // Voprosy Med. Khimii. – 1986. – 32. – N6. – P. 75-79.
6. Baveye S., Ellass E., Mazurier J. et al. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process // Clin. Chem. Lab. Med. – 1999. – №37. – P. 281-286.
7. Lonnerdal B., Iyers S. Lactoferrin: molecular structure and biological function // Annu. Rev. Nutr. – 1995. – №5. – P. 93-100.
8. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P. 265-275.

Accepted in 09.04.2002