

Е.В. ПЕТРУШКО, Д.М. БОГДАНОВИЧ, А.И. БУДЕВИЧ,
В.Н. КУЗНЕЦОВА, Н.Л. ЗАРЕМБА, Т.Н. БРОВКО

**МОНИТОРИНГ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ
РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА
В МОЛОКЕ ГЕННОМОДИФИЦИРОВАННЫХ КОЗ
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛАКТАЦИИ**

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В статье представлены результаты мониторинга уровня продукции рекомбинантного лактоферрина человека в молоке генномодифицированных коз при длительной лактации.

Определена концентрация рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных коз F₃, F₄, F₅ при длительной лактации. Установлено, что в течение 10-ти месяцев концентрация рекомбинантного лактоферрина человека в молоке животных находилась в диапазоне 4,4-7,01 г/л. Среднее значение указанного показателя отмечалось на уровне 6,25±10 г/л, медиана – 6,36 г/л или 0,62 % в 1 литре молока.

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивой секреции рекомбинантного лактоферрина человека клетками молочной железы вымени трансгенных животных F₃, F₄, F₅.

Ключевые слова: генномодифицированные козы, молоко, рекомбинантный лактоферрин человека, трансген.

E.V. PETRUSHKO, D.M. BOGDANOVICH, A.I. BUDEVICH, V.N. KUZNETSOVA,
N.L. ZAREMBA, T.N. BROVKO

**MONITORING OF PRODUCTION LEVEL OF RECOMBINANT HUMAN
LACTOFERRIN IN MILK OF GENETICALLY MODIFIED GOATS DURING
PROLONGED LACTATION**

*Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

The paper presents the results of monitoring of production level of recombinant human lactoferrin in milk of genetically modified goats during prolonged lactation.

Concentration of recombinant human lactoferrin has been determined in milk of transgenic goats F₃, F₄, F₅ during prolonged lactation. It has been found that concentration of recombinant human lactoferrin in animal's milk had been in the range of 4.4-7.01 g/l for 10 months. The average value of this indicator was recorded at the level of 6.25±10 g/l, median – 6.36 g/l or 0.62% in 1 liter of milk.

The results obtained indicate stable secretion of recombinant human lactoferrin by mammary gland cells of udder of transgenic animals F₃, F₄, F₅.

Keywords: genetically modified goats, milk, recombinant human lactoferrin, transgene.

Введение. Лактоферрин (LF) представляет собой катионный железосвязывающий гликопротеин с молекулярной массой 78-80 кДа, со-

держатся во многих секретах организма, в том числе в секретах органов пищеварительной, респираторной и репродуктивной систем. Данный белок выявлен в высокой концентрации в молозиве (до 8 мг/мл) и в более низкой концентрации в молоке животных (0,1-0,3 мг/мл). Кроме того, LF продуцируется вторичными гранулами нейтрофилов, которые выделяют этот белок в очагах инфекции. Лактоферрин, присутствующий в молоке, вырабатывается специфическими гранулами полиморфноядерных лейкоцитов и эпителиальными клетками молочной железы [1, 2].

Получение трансгенных животных-продуцентов лекарственных субстанций для фармацевтической промышленности – одно из приоритетных направлений генно-инженерных разработок в современной биотехнологии, т. к. позволяет производить целевые белки в больших количествах и с большей экономической выгодой по сравнению с существующими методами [3]. Только молочная железа домашних животных способна осуществлять посттрансляционные модификации, которые необходимы для обеспечения биологической активности и стабильности белка, такие как гликозилирование, расщепление и т. д. [4, 5].

В настоящее время в ряде стран получены козы-продуценты рекомбинантного LF. Уровень вырабатываемого рекомбинантного белка клетками молочной железы в каждом случае различный. По данным Zhang et al. [6], концентрация целевого гликопротеина в молоке трансгенных животных составляла от 0,765 до 2,6 г/л. В исследованиях других авторов [7, 8] сообщается о создании трансгенов, продуцирующих с молоком более 30 мг/мл белка со стабильным содержанием в течение всего лактационного периода.

В Республике Беларусь биотехнология трансгенеза сельскохозяйственных животных реализована на примере рекомбинантного лактоферрина человека (далее – рчЛФ), продуцируемого с молоком коз-продуцентов, содержащихся на Биотехнологическом научно-экспериментальном производстве по трансгенезу животных РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Средний уровень продукции рекомбинантного лактоферрина человека в молоко таких животных составил 3,3 г/л, 5,76 и 5,47 г/л для продуцентов первого, второго и третьего лактационного периодов соответственно [2, 9].

Доказано, что рчЛФ обладает эффектами, характерными для природного лактоферрина женского молока (антибактериальными, противовирусными, иммуномодулирующими, регенеративными), а также оказывает положительное воздействие на микрофлору кишечника [10, 11]. Свойства рекомбинантного белка при сопоставлении с природным человеческим LF показали идентичность биохимических и физико-

химических характеристик, что, в свою очередь, предопределяет обширную степень совпадения их биологических активностей [12, 13].

Некоторыми исследователями установлено, что благодаря способности индуцировать синтез эритропоэтина апоформа рЧЛФ участвует в активации Nrf2 – ключевого транскрипционного фактора клеточной антиоксидантной системы. В результате апоформа рЧЛФ демонстрирует выраженные нейропротекторные эффекты на животных моделях болезни Паркинсона и рассеянного склероза [14].

Другими исследователями выявлено, что, как диетический фактор, рЧЛФ способствует благоприятным изменениям в составе кишечной микробиоты, а также повышению функциональной активности и улучшению тонкой структуры кишечника у крыс. Установлено, что диета с рЧЛФ вызывала морфологические изменения не только в кишечнике, но и в печени, а пероральное употребление рЧЛФ крысами приводило к увеличению концентрации в сыворотке крови общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП, тестостерона и прогестерона на фоне снижения уровня эстрадиола [15].

Семак И.В. с соавторами [12] в своих исследованиях установили, что рЧЛФ потенциально может применяться в качестве нового терапевтического средства в лечении гормональных расстройств, а также при нарушении баланса микробиоты кишечника. Терапевтические подходы, основанные на использовании рЧЛФ в комбинации с цитостатиками, могут применяться для повышения эффективности химиотерапии онкологических заболеваний. Нейропротекторные свойства рЧЛФ могут использоваться в терапии нейротравм и нейродегенеративных заболеваний.

Необходимо отметить, что проведённая в 2019 г. государственная экспертиза стада коз-продуцентов рЧЛФ на безопасность показала отсутствие негативного влияния трансгенных животных на здоровье человека и состояние окружающей среды. В результате этого выдано разрешение на хозяйственное использование генномодифицированных коз в качестве источника получения рекомбинантного лактоферрина человека.

Таким образом, использование животных-продуцентов в качестве биореакторов для производства рекомбинантных белков человека представляет собой новое перспективное направление в фармпроизводстве страны. При этом одним из важнейших элементов повышения эффективности использования стада трансгенных животных является постоянный мониторинг уровня продукции целевого белка в молоко, который обусловлен влиянием на него ряда факторов.

Цель исследований – определение уровня продукции рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных животных, полученных в поколении F₃, F₄, F₅ при длительной лактации.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в 2019 году в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» на трансгенных лактирующих козах F₃, F₄, F₅ 2-3 года лактации живой массой 30-40 кг, полученных после искусственного осеменения трансгенных самок спермой не-трансгенных козлов-производителей зааненской породы.

Во время проведения исследований учитывался период непрерывной лактации животных с февраля по ноябрь, при этом, начиная с марта, группа периодически дополнялась продуцентами, а с сентября количество их уменьшилось и в ноябре достигло 20 голов.

Количество коз-продуцентов и отобранных образцов молока в разрезе исследуемого периода представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Количество коз, участвующих в эксперименте, и число отобранных образцов сборного молока

Количество	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь
Козы, гол.	10	15	35	35	35	44	40	36	26	20
Пробы, шт.	28	31	30	31	30	31	31	30	31	30

Доение коз осуществлялось однократно в день с размещением животных на доильной установке «бок-о-бок» (GEA Westfalia, Германия). Вымя животных подвергалось обработке в соответствии с гигиеническими требованиями до и после процедуры доения. Молоко собиралось в доильный бак и выдерживалось в течение 2-х часов. Перед отбором образцов сырьё тщательно перемешивалось, пробы помещались в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, которые маркировались и замораживались в морозильной камере при -18 °С. В целом было отобрано 303 образца.

Концентрация рчЛФ в молоке определялась с использованием набора для ELISA, разработанного ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводился с использованием считывающего микропланшетного ридера Sunrise (Tecan, Австрия) и пакета программ Magellan™ 6 (Текан, Австрия). Принцип метода измерения заключался в последовательной сорбции LF из образцов с известными концентрациями (6,25-400 нг/мл) и тестируемых проб разведённого молока в лунках планшета, поверхность которых была предварительно покрыта аффинными антителами против LF, с последующей реакцией вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой из корней хре-

на. Раствор первичных антител против LF подкрашивался синим красителем, раствор вторичных антител не содержал красителя. После каждого этапа избыток реагентов удалялся промывкой буферным раствором. В конце ИФА с помощью хромогенного субстрата выявлялась пероксидазная метка, реакция останавливалась серной кислотой. Далее выполнялось фотометрическое измерение оптической плотности растворов в лунках при длине волны 492 нм с использованием фотометра Tecan Sunrise (Tecan, Австрия). По калибровочной зависимости оптической плотности от концентрации LF производился расчёт концентрации LF в тестируемых образцах.

Полученные результаты были обработаны статистически с помощью приложения Microsoft Office Excel.

Результаты эксперимента и их обсуждение. В ходе исследования в течение 10-ти месяцев сборного молока коз-производителей рчЛФ, полученного от коз-производителей F₃, F₄, F₅, выявлен высокий уровень синтеза гликопротеина. Так, диапазон концентраций находился в пределах 4,4-7,01 г/л, среднее значение составило 6,25±10 г/л, медиана – 6,36 г/л или 0,62 % в 1 литре молока (рисунок 1).

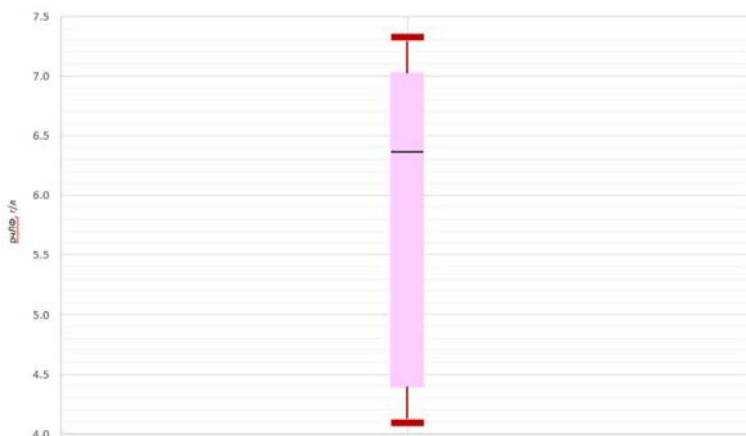


Рисунок 1 – Концентрация рчЛФ в течение 10 месяцев исследований

Средняя концентрация рекомбинантного лактоферрина была сопоставима в феврале и марте ($4,40 \pm 0,31$ г/л и $4,67 \pm 0,21$ г/л соответственно) (рисунок 2 и 3). В этом временном промежутке отмечено самое низкое содержание белка.

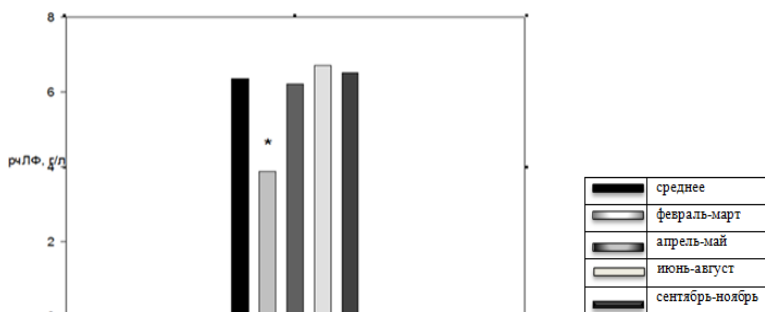


Рисунок 2 – Динамика концентрации по рЧЛФ по сезонам

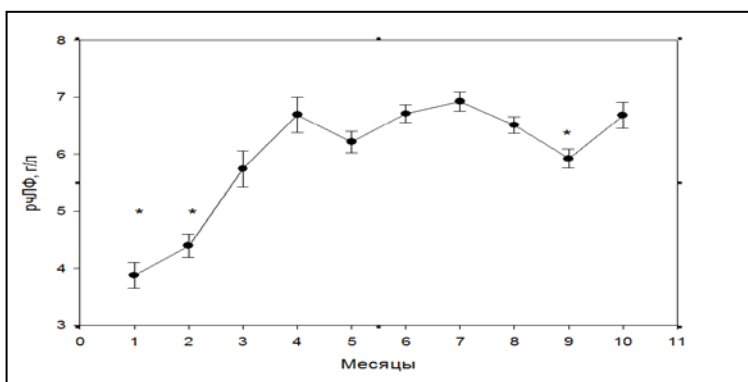


Рисунок 3 – Динамика концентрации по рЧЛФ по месяцам (1-10 соответствует месяцам с февраля по ноябрь)

В период с апреля по ноябрь (рисунок 2 и 3) отмечалась тенденция роста количества рекомбинантного белка в сборном молоке – $6,23 \pm 0,32$ г/л (апрель, $P < 0,001$); $7,01 \pm 0,31$ г/л (май); $6,40 \pm 0,19$ г/л (июнь); $6,88 \pm 0,16$ г/л (июль); $7,0 \pm 0,17$ г/л (август); $6,62 \pm 0,15$ г/л (сентябрь); $5,57 \pm 0,17$ г/л (октябрь, $P < 0,001$); $6,8 \pm 0,23$ г/л (ноябрь, $P < 0,001$) (рисунок 3). Итоговые ежемесячные результаты показали, что концентрация рЧЛФ существенно не менялась по отношению ко времени года. Амплитуда колебания стандартных отклонений не имела существенного разброса значений.

В свою очередь, в разрезе месяцев отмечаются дни с самым низким уровнем гликопротеина в молоке – первая декада марта, где концентрация белка находилась на отметке $2,32$ г/л. Пик максимального содержания рекомбинантного белка наблюдался в апреле, мае, августе – до $9,4$ г/л, $12,4$ и $9,5$ г/л соответственно.

В целом, концентрация рчЛФ в сборном молоке имела тенденцию к увеличению в тёплое время года (рисунок 2 и 3). Так, среднее содержание белка между периодами февраль-март, сентябрь-ноябрь (диапазон 4,57-6,73 г/л) и апрель-июнь, август (диапазон 6,27-7,24 г/л) составила разницу 20 % ($P < 0,001$) или 1,12 г/л.

Результаты исследований согласуются с нашими предыдущими данными по содержанию гликопротеина на разных стадиях лактации животных [10, 11]. Можно предположить, что низкая вариабельность полученных результатов отражает тот факт, что козы-продуценты принадлежат к одной и той же линии трансгенных животных.

Заключение. Проведённые исследования подтвердили стабильность передачи гена лактоферрина и продемонстрировали эффективность синтеза рекомбинантного белка человека животными-продуцентами F₃, F₄, F₅ с длительной лактацией. Установлен высокий уровень целевого гликопротеина – диапазон его концентраций находился в пределах 4,4-7,01 г/л, среднее значение составило 6,25±10 г/л, медиана – 6,36 г/л или 0,62 % в 1 литре молока. При этом признаки, связанные с влиянием встроенной генной конструкции и наличием рчЛФ в молоке продуцентов на лактирующий статус животных и состояние их здоровья, отсутствовали.

Литература

1. Богданович, Д. М. Экспрессия рекомбинантного лактоферрина человека в молоке коз-продуцентов в течение года / Д. М. Богданович, Е. В. Петрушко // *Новости науки в АПК: инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса : материалы VI междунар. конф.*, – Ставрополь, 2018. – С. 168-172.
2. Петрушко, Е. В. Качественная характеристика молока коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина человека третьего и четвертого года лактации / Е. В. Петрушко, Д. М. Богданович // *Перспективные аграрные и пищевые инновации : материалы междунар. науч.-практ. конф.*, г. Волгоград, 6-7 июня 2019 г. – Волгоград, 2019. – Ч. 1. – С. 161-171.
3. Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods / C. Conesa [et al.] // *Biotechnol Adv.* – 2010. – Vol. 28. – P. 831–838.
4. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins / A. J. Clark [et al.] // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* – 1998. – Vol. 3 – P. 337–350.
5. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals / L. M. Houdebine [et al.] // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* – 2009. – Vol. 32. – P. 107–121.
6. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats / J. Zhang [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 2008. – Vol. 57(2). – P. 127-135.
7. High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors / Z. S. Han [et al.] // *Protein Expr. Purif.* – 2007. – Vol. 53. – P. 225-231.
8. The dominant expression of functional human lactoferrin in transgenic cloned goats using a hybrid lactoferrin expression construct / H. Yua [et al.] // *Journal of Bio-technology.* – 2012. – Vol. 53. – P. 198–205.

9. Динамика рекомбинантного лактоферрина человека, продуцируемого с молоком коз в различные сезоны года / А. И. Будевич [и др.] // Современные проблемы ветеринарной патологии и биотехнологии в агропромышленном комплексе : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского», г. Минск, 16-17 ноября 2017 г. – Минск, 2017. – С. 402-407.

10. Recombinant human lactoferrin from transgenic goats: isolation and physicochemical properties / I. Semak [et al.] // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. – Mazatlan, Mexico. – P-VI-6. – P. 74.

11. Recombinant human lactoferrin expressed in transgenic goats / A. Budzevich [et al.] // The Xth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and applications, 08–12 May, 2011. – Mazatlan, Mexico. – O-VI-2. – P. 66.

12. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin / I. Semak [et al.] // Transgenic Research. – 2019. – Vol. 28 – P. 465-478.

13. Физико-химические показатели молока коз-продуцентов рекомбинантного лактоферрина третьего и четвертого года лактации / А. И. Будевич [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр., посвящ. 70-летию со дня основания Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по животноводству. – Жодино, 2019. – Т. 54, ч. 2 : Технология кормов и кормления, продуктивность. Технология производства, зоогигиена, содержание. – С. 141-147.

14. Erythropoietin and Nrf2: key factors in the neuroprotection provided by apo-lactoferrin / E. T. Zakharova [et al.] // Biometals. – 2018. – Vol. 31(3). – P. 425-443.

15. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects / V. S. Lukashevich [et al.] // Doklady Nat. Acad. Sci. Belarus. – 2016. – Vol. 60(1). – P. 72-81.

Поступила 25.05.2020 г.

УДК 636.32/.38.035

И.А. ПОМИТУН¹, Н.А. КОСОВА¹, И.В. КОРХ¹,
Л.П. ПАНЬКИВ¹, Н.В. БОЙКО¹, Л.И. ПОМИТУН¹,
А.И. ЧАЛЫЙ²

КАЧЕСТВО ШЕРСТИ ОВЕЦ ПОРОДЫ ПРЕКОС И ИХ ПОМЕСЕЙ

¹*Институт животноводства Национальной академии аграрных наук
Украины, г. Харьков, Украина*

²*Харьковская государственная зооветеринарная академия
МОН Украины, пгт. Малая Даниловка, Украина*

В статье приведены результаты оценки настрига невыттой шерсти, выхода и настрига мытой шерсти, длины и толщины шерсти на различных участках рун, а также величины и направления корреляций между основными селекционными признаками. Исследования проведены на взрослых баранах и молодняке 14-месячного возраста породы преко-с (харьковский внутривидовый тип – ХВПТТ), а также помесях от скрещивания с