

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

Костевич Валерия Александровна

**ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ЛАКТОФЕРРИНА**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Соколов Алексей Викторович,

доктор биологических наук.

Санкт-Петербург, 2016 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Кислород как участник биохимических реакций.....	9
1.2. Транскрипционный комплекс гипоксия-индуцибельного фактора (HIF): кислород-зависимая регуляция.....	12
1.3. Гены-мишени HIF.....	19
1.4. Миметики гипоксии: кобальт, никель и хелаторы железа.....	22
1.5. Регуляция гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) активными формами кислорода.....	27
1.6. Кислород-независимая регуляция гипоксия-индуцибельного фактора (HIF).	30
1.7. Лактоферрин – физико-химические свойства, функции, связь с метаболизмом железа.....	31
1.8. Заключение по обзору литературы: сравнение лактоферрина и дефероксамина.....	34
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Реактивы, использованные в работе.....	37
2.2. Хроматографические методы.....	37
2.2.1. Синтез сорбентов.....	37
2.3. Спектрофотометрия.....	39
2.4. Аналитические методы.....	39
2.4.1. Пара-фенилендиамин-оксидазная активность церулоплазмينا.....	39
2.4.2. Ферроксидазная активность церулоплазмينا.....	39
2.4.3. Измерение концентрации гемоглобина.....	40
2.4.4. Измерение концентрации железа в сыворотке крови.....	40
2.5. Электрофоретические методы.....	40
2.5.1. Диск-электрофорез в щелочной системе.....	40
2.5.2. Диск-электрофорез в кислой системе.....	41
2.5.3. Электрофорез в щелочной системе в присутствии SDS.....	41
2.5.4. Электрофорез в присутствии SDS в высокомолярной Tris-буферной системе.....	42
2.6. Получение белковых препаратов.....	42
2.6.1. Выделение церулоплазмينا сыворотки крови крыс и мышей.....	42
2.6.2. Выделение лактоферрина грудного молока.....	42
2.6.3. Выделение трансферрина из сыворотки крови человека.....	43
2.6.4. Подготовка образцов тканей для выявления иммунореактивных белков.....	43
2.7. Иммунохимические методы.....	44
2.7.1. Подготовка антигенов для иммунизации.....	44

2.7.2. Иммунизация кроликов	44
2.7.3. Выделение иммуноглобулинов G сыворотки.....	44
2.7.4. Вестерн-блоттинг	45
2.7.5. Твердофазный иммуноферментный анализ эритропоэтина	46
2.7.6. Ракетный иммуноэлектрофорез церулоплазмина крыс.....	47
2.8. Изучение антигипоксической активности	47
2.9. Изучение антианемической активности	48
2.9.1. Модель постгеморрагической анемии	48
2.9.2. Модель гемолитической анемии.....	48
2.10. Содержание крыс на диете с хлоридом серебра	48
2.11. Статистическая обработка результатов	49
2.12. Получение образцов от здоровых доноров и лабораторных животных	50
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	51
3.1. Исследование антигипоксической активности лактоферрина на модели острой гипоксии с гиперкапнией у мышей	51
3.2. Исследование антианемической активности лактоферрина на моделях острой постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс	52
3.3. Исследование влияния лактоферрина на иммунореактивные гипоксия-индуцибельные факторы 1-альфа и 2-альфа, эритропоэтин и церулоплазмин в образцах тканей мышей и крыс	58
3.4. Исследование влияния выключения ферроксидазной активности церулоплазмина у крыс, получавших диету с AgCl, на защитные свойства лактоферрина	61
3.5. Исследование влияния введения апо-лактоферрина беременным и лактирующим крысам на стабильность гипоксия-индуцибельных факторов у их потомства	69
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	71
5. ВЫВОДЫ.....	79
6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	80
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	84

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Основной белок грудного молока, лактоферрин (ЛФ), относится к группе moonlighting proteins, отвечая её трем основным признакам: представлен несколькими изоформами, синтезируется различными типами клеток и проявляет чрезвычайную полифункциональность, в том числе за счёт участия в ряде белок-белковых взаимодействий. Сотни лабораторий по всему миру интенсивно исследуют разнообразные функции ЛФ, с 1991 года до настоящего времени каждые два года проводятся международные конференции, посвященные этому белку. Помимо грудного молока, ЛФ выявлен практически во всех экзокринных секретах (слёзная жидкость, слюна, семенная и цервикальная жидкость) и секреторных гранулах нейтрофилов. Описано несколько изоформ ЛФ (дельта-ЛФ, изоформы ЛФ с различной выраженностью гидролитической активности в отношении нуклеиновых кислот, АТФ и олигосахаридов) и несколько типов клеточных рецепторов для ЛФ. В настоящее время доказаны функции ЛФ как антимикробного и противовирусного агента, ростового фактора желудочно-кишечного тракта и костной ткани, иммуномодулятора, эффективного липолитического, противоопухолевого и антианемического агента. Будучи одним из сильнейших хелаторов ионов железа (III) белковой природы, ЛФ создает железodefицитную среду, препятствуя росту патогенных микроорганизмов. Учитывая тесную связь метаболизма железа с регуляцией адаптации к гипоксии, нами была предпринята попытка исследовать антигипоксические и антианемические свойства ЛФ, а главное, молекулярный механизм их реализации.

Регуляция адаптации к гипоксии тесно связана с развитием таких патологических процессов, как железodefицитная анемия, опухолевый рост, генерация активных форм кислорода (АФК), воспаление и апоптоз. Учитывая, что ЛФ является мажорным белком грудного молока и особенно молозива, практически не подвергается деградации в желудочно-кишечном тракте младенца и преодолевает гематоэнцефалический барьер, прояснение молекулярных механизмов его участия в адаптационных процессах важно для понимания функций этого белка при грудном вскармливании. Последнее особенно важно при создании искусственных смесей для вскармливания новорожденных.

Степень разработанности темы исследования

Ранее в Отделе молекулярной генетики Института Экспериментальной Медицины (Санкт-Петербург) Еленой Тихоновной Захаровой при изучении медь-содержащего белка церулоплазмينا (ЦП) в молозиве и грудном молоке был обнаружен его комплекс с ЛФ [Zakharova et al., 2000]. Оказалось, что такой комплекс также присутствует в норме в слёзной

жидкости, а при воспалении образуется в кровотоке, вероятно, вследствие дегрануляции нейтрофилов. Биохимическая характеристика комплекса ЦП-ЛФ выявила усиление ферроксидазной активности ЦП при взаимодействии с ЛФ, что явилось предпосылкой для исследования антигипоксической и антианемической активности ЛФ и её молекулярных механизмов. На момент начала этих исследований лишь в одной лаборатории в мире практически одновременно с нами был зафиксирован антианемический эффект ЛФ. Позже обнаруженный нами в 2012 году антигипоксический эффект лактоферрина был подтвержден в 2013 году на уровне организма (поросята) [Nguyen et al., 2014] и в 2014 году при исследовании клеточной культуры (нейробластома) [Park et al., 2014].

Цель

Выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе антигипоксической активности лактоферрина, и их связь с его антианемическими свойствами.

Задачи

1. Изучить влияние железо-насыщенной и апо-форм лактоферринов человека и коровы на устойчивость мышей к острой гипоксии с гиперкапнией.
2. Исследовать антианемическое действие железо-насыщенной и апо-форм лактоферрина при экспериментальной постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс.
3. Выявить наличие иммунореактивных гипоксия-индуцибельных факторов 1 и 2-альфа, эритропоэтина и церулоплазмينا в образцах тканей мышей и крыс, получавших различные дозы препаратов лактоферрина.
4. Изучить влияние экспериментального блокирования ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс на протективные свойства лактоферрина.
5. Исследовать влияние введения лактоферрина беременным и лактирующим крысам на стабильность гипоксия-индуцибельных факторов и экспрессию их генов-мишеней у потомства.

Научная новизна

В результате проведенных исследований впервые показана антигипоксическая активность апо-формы ЛФ при введении мышам. Впервые выявлена стабилизация гипоксия-индуцибельных факторов 1 и 2 альфа (HIF-1 α и HIF-2 α), а также индукция синтеза белковых продуктов их генов-мишеней ЦП и эритропоэтина (ЭПО) в органах животных, получавших

апо-ЛФ. Впервые на модели выключения ферроксидазной активности церулоплазмينا показано, что антианемический и антигипоксический эффекты апо-формы ЛФ регулируются по принципу отрицательной обратной связи ферроксидазной активностью ЦП. Продемонстрировано, что апо-форма ЛФ способна вызывать индукцию HIF-сигнального пути при пероральном введении грызунам и при вскармливании потомства самками, получавшими ЛФ внутрибрюшинно и перорально.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования проясняют молекулярные механизмы, лежащие в основе антигипоксической и антианемической активности апо-формы ЛФ. Стабилизация HIF-1 α и HIF-2 α под действием апо-формы ЛФ, а также индукция синтеза ключевых участников метаболизма железа и эритропоэза (ЦП и ЭПО) являются предпосылкой для изучения нейро- и кардиопротективных свойств ЛФ. Регуляция активности апо-формы ЛФ под действием ферроксидазной активности ЦП является основой для понимания функциональной взаимосвязи железо-связывающих свойств ЛФ и активируемой им ферроксидазы (ЦП). По результатам работы был оформлен патент РФ, посвященный применению ЛФ в качестве физиологического миметика гипоксии.

Методология и методы исследования

Исследование молекулярных механизмов реализации антигипоксической и антианемической активности ЛФ выполнено с использованием высокоочищенного препарата белка с привлечением методов биохимии и иммунохимии. Были разработаны модели острой гипоксии с гиперкапнией у мышей, постгеморрагической анемии у крыс, адаптирована модель гемолитической анемии для крыс, использована разработанная в Отделе молекулярной генетики модель выключения ферроксидазной активности церулоплазмينا. Были охарактеризованы свойства ЦП, выделенного из крови крыс, получавших AgCl с пищей. Для очистки белков, анализа параметров метаболизма железа и иммунохимической детекции белков было использовано более 20 методов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Антигипоксическая активность характерна для апо-формы лактоферрина человека и коровы, но не насыщенных железом препаратов белка.
2. При экспериментальной постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс антианемическая активность выявлена только у апо-формы лактоферрина.

3. Стабилизация гипоксия-индуцибельных факторов 1-альфа и 2-альфа, увеличение синтеза эритропоэтина и церулоплазмينا в образцах тканей мышей и крыс выявлены при внутривнутрибрюшинном, *per os* и интраназальном введении апо-формы лактоферрина.

4. Усиление антианемических свойств апо-формы лактоферрина связано с дефицитом ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс, получавших AgCl с пищей.

5. После введения лактирующим крысам апо-лактоферрина увеличивается стабильность гипоксия-индуцибельных факторов и экспрессия их генов-мишеней у потомства.

Степень достоверности и апробации результатов

Результаты получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: Xth, XIth International Conference on Lactoferrin «Structure, Function and Application» (Мексика, Масатлан, 2011; Италия, Рим, 2013), VII, VIII и IX крымских конференциях «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Украина, Судак, 2011–2013), Международных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Беларусь, Минск, 2012; 2014; 2016), X юбилейной и XI международных конференциях «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Абхазия, Пицунда, 2014; Гагра, 2015), VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, 3 из которых – статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, представленные в “PubMed”; 6 тезисов конференций; получен 1 патент РФ.

Личный вклад соискателя

Личный вклад автора состоял в анализе литературы по проблеме исследования, планировании экспериментов и их выполнении, статистической обработке полученных результатов, обсуждении результатов, подготовке публикаций по теме диссертации, написании автореферата. Участие автора в анализе литературы – 95%, статистической обработке

результатов – 90%, подготовке статей и тезисов докладов – 90%, написании диссертации и автореферата – 95-100%.

Структура диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 328 источников, из них 7 – отечественных. Диссертация изложена на 107 страницах. Результаты и обсуждение представлены в 3 таблицах и иллюстрированы 22 рисунками.

Финансовая поддержка и благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: №№ 08-04-00905, 09-04-00742, 13-04-01186, грантов президента РФ: МК-1484.2012.4, МК-6062.2014.4, а также программы РАМН «Протеом человека».

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Кислород как участник биохимических реакций

Кислород – самый распространённый элемент на Земле, был выделен в свободном виде Карлом Шееле (1771 г.), Джозефом Пристли (1774 г.) и Антуаном Лавуазье (1775 г.), они экспериментально доказали роль кислорода в процессах горения и дыхания. В атмосферном воздухе кислород составляет 21% от объёма (23% от веса), выступая в качестве окислителя во множестве биохимических реакций в живых системах [Азимов, 1983]. Вероятно, наиболее важной последовательностью биохимических реакций, включающих кислород, является окислительное фосфорилирование, где он выступает как конечный акцептор электронов. Этот процесс необходим для превращения электрохимического потенциала в химическую энергию, а значит, является критическим компонентом аэробного метаболизма [Mitchell and Moyle, 1965]. Кислород также необходим для метаболизма целого ряда эндогенных соединений, таких как аминокислоты, стероиды, жирные кислоты, простагландины, а также экзогенных веществ, таких как лекарственные средства, токсины и канцерогены. Кислород необходим для синтеза нейротрансмиттеров, например, катехоламинов, а также начальных этапов синтеза меланина [Mannaerts and Van Veldhoven, 1993; Penzes et al., 1993; Poon et al., 2004]. Ряд белок-белковых взаимодействий включает кислород-зависимое гидроксильное окисление аминокислотных остатков (а.о.). Так, гидроксильное окисление остатков пролина в коллагене необходимо для стабилизации тройной коллагеновой спирали при физиологических условиях. Цепи коллагена, не содержащие 4-гидроксипролина, не способны образовать тройные спиральные молекулы, стабилизирующие соединительную ткань [Pihlajaniemi et al., 1991]. Позже будет подробно рассмотрено кислород-зависимое гидроксильное окисление а.о. пролина гипоксия-индуцибельного фактора (HIF), необходимое для его взаимодействия с белком фон Хиппель Линдау (pVHL) [Ivan et al., 2001].

Хотя кислород является сильным окислителем и практически все реакции с его участием энергетически выгодны, в живом организме участие ферментов в кислород-зависимых реакциях увеличивает скорость и специфичность окислительно-восстановительных реакций. В 1950-х впервые было показано существование фермента, который опосредует активацию и перенос кислорода в виде гидроксильной группы на молекулу субстрата. Первоначально был сделан неправильный вывод о том, что источником кислорода в гидроксильной группе является молекула воды. Ферменты, которые катализируют реакцию с участием молекулярного кислорода, были названы оксигеназами [Hayaishi and Nozaki, 1969]. Диоксигеназами назвали ферменты, которые включают два атома кислорода в молекулу субстрата, а монооксигеназами – ферменты, восстанавливающие один атом кислорода до молекулы воды и включающие второй атом в молекулу субстрата, тогда как оксидазы восстанавливают два атома кислорода до

воды. Такие ферменты содержат ионы металлов переменной валентности (как правило, железо или медь) в активном центре. Ионы металлов переходной группы вовлечены в химическую активацию либо распад молекулярного кислорода на два атома, поскольку легко превращаются из восстановленной формы в окисленную и обратно. Ферменты, механизм действия которых включает активацию молекулярного кислорода, разделяют на два больших семейства: гем-содержащие и негемовые ферменты. Гем-содержащие ферменты, например цитохромы P₄₅₀, пероксидазы, хлоропероксидазы и NO-синтазы, содержат геминовую простетическую группу, протопорфирин IX, в которой железо координируется атомами азота порфиринового кольца и аксиальным лигандом - цистеином либо гистидином [Sono et al., 1996]. Большое семейство негемовых оксигеназ, встречающихся у про- и эукариот, характеризуется необходимостью в 2-оксоглутарате в качестве косубстрата [Ryle and Hausinger, 2002]. По данным рентгеноструктурного анализа нескольких представителей этого семейства (Рис. 1.1) лигандами негемового железа являются два а.о. гистидина, монодентатный карбоксил (а.о. аспартата) и две либо три молекулы воды [Solomon et al., 2003]. Указанные структурные особенности обуславливают большую подвижность железа и более низкую субстратную специфичность по сравнению с гем-содержащими ферментами. В процессе гидроксирования косубстрат 2-оксоглутарат декарбоксилируется и превращается в сукцинат. Этот 2-оксоглутарат-зависимый класс оксигеназ привлекает большое внимание, поскольку четыре его представителя, пролил-4-гидроксилазы (PHD1-3) и аспарагин гидроксилаза (FIH-1), вовлечены в регуляцию чувствительности клеток к дефициту кислорода [Ivan et al., 2001; Lando et al., 2002]. Данные ферменты гидроксилируют специфические а.о. в альфа-субъединице HIF в присутствии Fe²⁺, 2-оксоглутарата и аскорбата. Гидроксирование пролинов приводит к включению HIF-α в многокомпонентный комплекс вместе с опухолевым супрессором pVHL, который убиквитинилирует HIF-α, что служит сигналом для его протеасомной деградации [Maxwell et al., 1999]. Гидроксирование а.о. аспарагина блокирует взаимодействие HIF-α с трансактиватором p300 [Lando et al., 2002]. Предполагается, что активация молекулярного кислорода негемовыми ферментами включает образование Fe(IV)=O интермедиата, который ответственен за стадию окисления субстрата [Hewitson et al., 2003]. Такое промежуточное состояние было получено в виде синтетического комплекса с негемовым макроциклическим лигандом и охарактеризовано спектроскопически. В кристаллической структуре высокого разрешения длина связи между железом и кислородом – 1,646 Å, что подтверждает возможность существования промежуточного состояния Fe(IV)=O с негемовым лигандом [Rohde et al., 2003]. Скорость реакции гидроксирования HIF-α зависит от концентрации кислорода, железа, 2-оксоглутарата и аскорбата: дефицит каждого снижает скорость

гидроксилирования, что вызывает накопление HIF- α и в результате активирует гипоксия-индуцибельный сигнальный путь [Jewell et al., 2001; Ivan et al., 2002; Hewitson et al., 2002; Hirsilä et al., 2003].

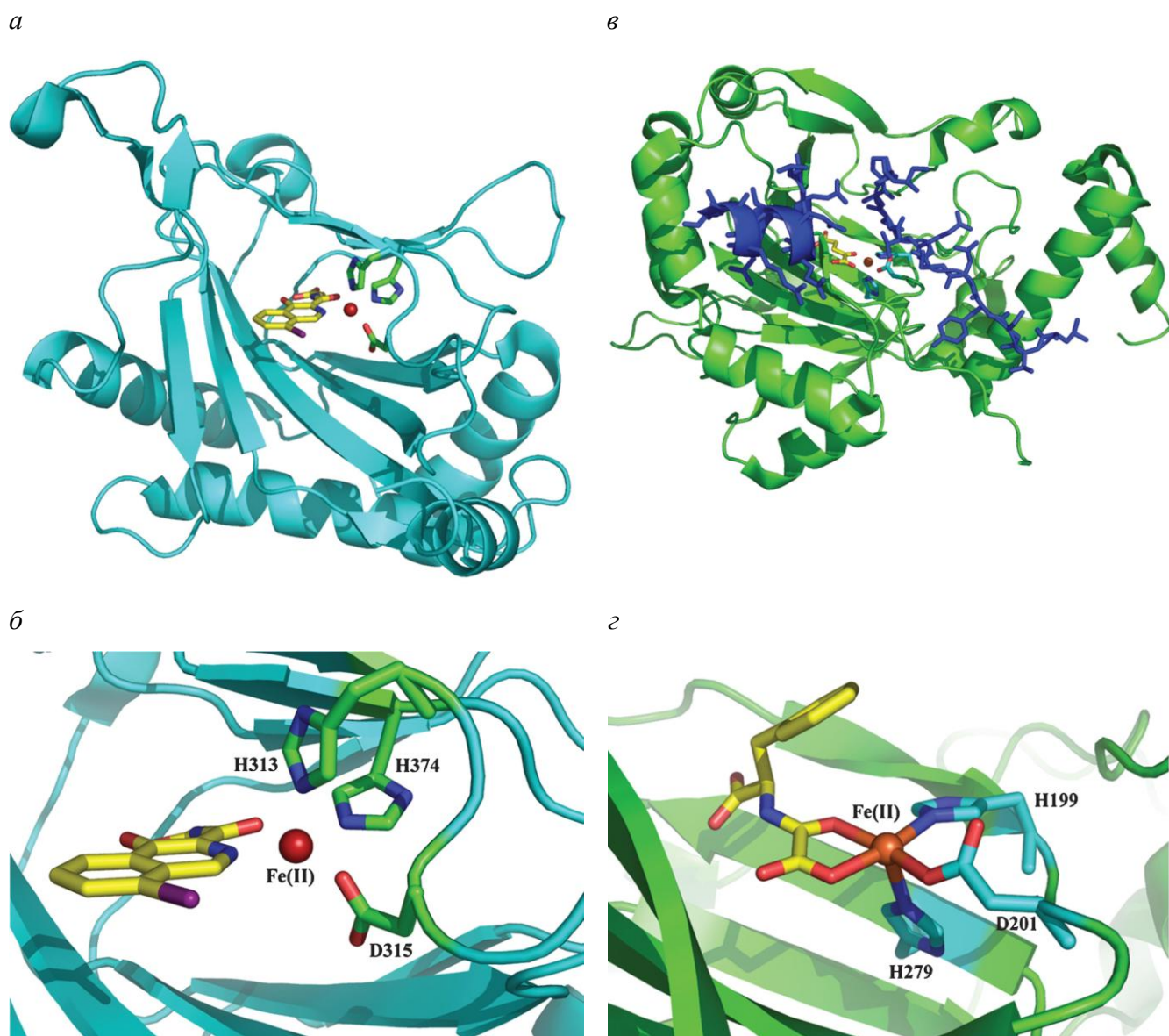


Рис. 1.1. Трёхмерные модели гидроксилаз HIF по данным рентгеноструктурного анализа.

a. Общий вид комплекса пролилгидроксилазы 2 (PHD2) с бициклическим ингибитором согласно модели PDB: 2G19. *б.* Вид активного центра PHD2: ион Fe(II) – красный; H313, D315, H374 – зелёный; ингибитор – жёлтый. *в.* Общий вид комплекса аспарагингидроксилазы (FIH) с фрагментом субстрата CAD и 2-оксоглутаратом согласно модели PDB: 1H2L. *г.* Вид активного центра FIH (PDB: 1YCI): ион Fe(II) – оранжевый; H199, D201, H279 – голубой; ингибитор N-оксалил-D-фенилаланин – жёлтый.

В отличие от большинства других оксигеназ HIF гидроксилазы характеризуются необычайно низкими значениями K_m для ионов железа и высокими – для кислорода, а именно, слегка выше концентрации O_2 в атмосфере (Таблица 1.1). Таким образом, скорость реакции гидроксирования чувствительна к концентрации железа и кислорода в физиологическом диапазоне концентраций [Hirsilä et al., 2003].

Таблица 1.1. Значения кажущихся K_m (мкМ) для гидроксилаз коллагена (CPH1-4) и HIF (PHD1-3 и FIH) [Hirsilä et al., 2003; Kukkola et al., 2003; Koivunen et al., 2004; Hirsilä et al., 2005; McNeill et al., 2005; Ehrismann et al., 2007; Koivunen et al., 2007; Myllyharju et al., 2008].

Субстрат	CPH1	CPH2	CPH3	FIH	PHD1	PHD2	PHD3
O_2	40	–	–	90–237	230	67–250	230
Fe^{2+}	2	2–4	0,5	0,5	0,03	0,03	0,1
2-оксоглутарат	20–22	33	20	24–147	2–60	<1–60	12–55
Аскорбат	300–340	330–340	370	260	170	180	140

1.2. Транскрипционный комплекс гипоксия-индуцибельного фактора (HIF): кислород-зависимая регуляция

В 1993 году Грег Семенца открыл HIF-1 как транскрипционный комплекс, связанный с гипоксия-чувствительным энхансером (hypoxia-responsive enhancer) на 3'-конце гена эритропоэтина (ЭПО) [Wang and Semenza, 1993a]. Компоненты комплекса, 120 кДа-альфа-субъединица и 91-94 кДа-бета-субъединица, были очищены в 11250 раз с выходом 22% (60 мкг) при фракционировании 120 литров экстракта ядер клеток линии HeLa (3 грамма белка) [Wang and Semenza, 1995]. Обе субъединицы относятся к семейству базальных спираль-петля-спираль (bHLH) транскрипционных факторов, содержащих PAS домен. Последний назван по первым буквам названий представителей этого семейства: Per (*Drosophila period*), ARN, ARNT/HIF-1 β (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation) и Sim (Single-minded), состоящих также из альфа- и бета-субъединиц. Бета-субъединица конститутивно экспрессируется и кроме участия в гипоксическом сигнальном пути также вовлечена в ответ на ксенобиотики, когда HIF-1 β образует димер с арилгидрокарбонным рецептором, формируя функциональный рецептор диоксина, что обуславливает альтернативное название HIF-1 β – ARNT [Wang and Semenza, 1995]. Внутри субъединиц выявлены гомологичные участки, названные А и В повторами, которые участвуют в белок-белковых взаимодействиях. Регуляторная гипоксия-чувствительная

субъединица, HIF-1 α , может быть выявлена в клетках, культивируемых при недостатке кислорода, но практически отсутствует в большинстве клеток при стандартных условиях культивирования вследствие постоянной и быстрой протеасомной деградации. Так, время полужизни HIF-1 α при нормоксии составляет менее 10 минут [Chun et al., 2002a]. При гипоксии HIF-1 α транслоцируется в ядро и образует димер с HIF-1 β . Образующийся комплекс HIF-1 связывается с консенсусной последовательностью (hypoxia-responsive element, HRE) содержащей HBS (HIF-1 binding site): –RCGTG–, а также с ацетилтрансферазой p300, выступающей в роли трансаактиватора транскрипции [Arany et al. 1996]. При снижении концентрации кислорода с 20 до 0,5% активация HIF увеличивается [Jiang et al., 1996].

Молекула HIF-1 α состоит из 826 а.о., содержит участки, вовлеченные в кислород-зависимую трансаактивацию и/или дестабилизацию, димеризацию и взаимодействие с ДНК (Рис. 1.2). На N-конце расположен основной домен (17-30 а.о.), затем HLH-домен (31-71 а.о.) и PAS-домен (85-298 а.о.), состоящий из А-повтора (85-158 а.о.) и В-повтора (228-298 а.о.) [Wang et al., 1995a]. В случае дефицита кислорода расположенный на С-конце молекулы трансаактивационный домен (CTAD) взаимодействует с CH1 (cysteine-histidine-rich) карманом p300, что активирует транскрипцию [Arany et al., 1996; Gu et al., 2001]. Этот домен также подразделяют на N-концевую часть (NAD, 531-575 а.о.) и С-концевую часть (CAD, 786-826 а.о.) [Pugh et al., 1997]. К комплексу HIF-p300 присоединяются дополнительные активаторы: гистоновые ацетилтрансферазы SRC-1 и TIF-2, а также редокс-фактор Ref-1 [Ema et al., 1999].

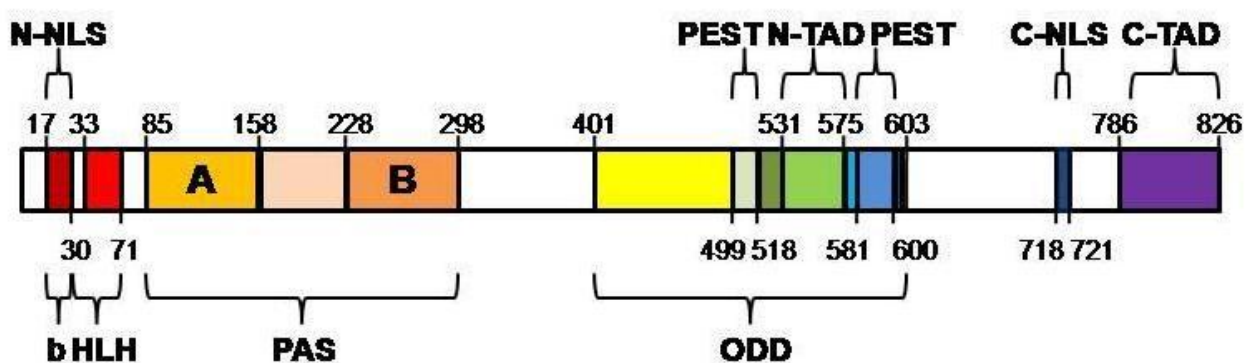


Рис. 1.2. Структурная организация HIF-1 α . Указаны номера первого и последнего а.о. доменов и их основных участков.

Димеризация HIF-1 α и HIF-1 β осуществляется в ядре и необходима как для взаимодействия с ДНК, так и для активации транскрипции [Kallio et al., 1997]. Дополнительно HIF-1 α содержит два сигнала ядерной локализации (NLS): 17-30 а.о. и 718-721 а.о., последний важен для

транспорта HIF в ядро [Kallio et al., 1998]. В отличие от HIF-1 β , присутствующего в ядре независимо от концентрации кислорода, ядерная транслокация HIF-1 α строго коррелирует с активностью HIF-1 и можно сделать преждевременный вывод, что транслокация регулируется гипоксией [Kallio et al., 1998]. Но в случае сверхэкспрессии HIF-1 α происходит его транслокация в ядро и при нормоксии. Таким образом, ядерная фракция HIF-1 α просто отражает общий уровень этого белка в клетке [Hofer et al., 2001]. Расположение HRE отличается у различных генов-мишеней: промоторный либо энхансерный регион (5'-область, 3'-область либо промежуточное положение). Особенности структуры HRE, метилирование цитозина либо наличие дополнительных транскрипционных факторов могут значительно влиять на HIF-1-зависимый ответ. Наряду с HBS большинство гипоксия-индуцибельных генов содержат HIF-1 вспомогательную последовательность (hypoxia ancillary sequence, HAS), расположенную на 8-9 пар оснований (п.о.) выше или ниже HBS [Kimura et al., 2001] и представляющую собой инвертированный повтор HBS с заменами (таблица 1.2).

Таблица 1.2. Нуклеотидная последовательность HRE: HBS и HAS в генах-мишенях HIF-1 человека [Kimura et al., 2001].

Ген		HBS	8 п.о.	HAS	
VEGF	CA	TACGTG	GGCTCCAA	CAGGT	CCT
ЭПО	CC	TACGTG	CTGTCTCA	CACAG	CCT
GLUT-1 (транспортёр глюкозы 1)	CA	GCGGTG	CCGTCTGA	CACGC	ATC
LDHA (лактатдегидрогеназа А)	CA	CACGTG	GGTCCCG	CACGT	ATC

Вероятно, для активации транскрипции важна вторичная структура ДНК. Как было сказано ранее, для эффективной активации транскрипции помимо HIF-1 важно связывание других, независимых от гипоксии транскрипционных факторов. Два и более близлежащих HRE были обнаружены в генах, кодирующих ферменты гликолиза, транспортёр глюкозы 1 и трансферрин. Также вблизи HRE были обнаружены сайты связывания ATF-1/CREB-1 фактора (activating transcription factor-1/cAMP response element-binding protein-1) в гене лактатдегидрогеназы А, AP-1 (activator protein-1) в гене VEGF, и HNF-4 (orphan receptor hepatic nuclear factor-4) в гене ЭПО [Wenger, 2002]. Перечисленные факторы могут модулировать HIF-1-зависимый ответ: увеличивать гипоксический ответ при дополнительных воздействиях и обеспечивать различную чувствительность тканей к гипоксии.

Домен кислород-зависимой деградации (ODD, 401-603 а.о.) взаимодействует с опухолевым супрессором pVHL (Рис. 1.3) в случае нормоксии [Maxwell et al., 1999]. Этот домен содержит так называемый PEST-подобный мотив, обогащенный а.о. Р, Е, S и Т (499-518 а.о. и 581-600 а.о.), распространённый среди белков с коротким временем полужизни [Rechsteiner and Rogers,

1996]. Выступая как часть E3 убиквитин-лигазного комплекса, pVHL узнает HIF-1 α , присоединяет элонгины В и С, куллин 2 и Rbx1, быстро убиквитинилирует HIF-1 α , что приводит к расщеплению в 26S протеасоме [Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Semenza, 2001]. Присоединение pVHL требует гидроксилирования HIF-1 α по а.о. P402 и P564, которые могут взаимодействовать с поверхностью кармана β -домена pVHL только после их модификации [Bonicalzi et al., 2001; Masson et al., 2001; Min et al., 2002; Hon et al., 2002]. Перед а.о. Р расположена консервативная последовательность: LXXLA(P), было показано, что а.о. L562 необходим для гидроксилирования P564 [Ivan et al., 2001].

С ODD доменом HIF-1 α также взаимодействует ацетилтрансфераза ARD1, ацетилирующая а.о. K532 с участием ацетил-коэнзима А [Jeong et al., 2002]. Уровень ацетилирования критичен для протеасомной деградации HIF-1 α [Tanimoto et al., 2000] и постепенно снижается при увеличении времени гипоксии, что связано с уменьшением экспрессии ARD1. Сайт-направленный мутагенез K532R, препятствующий ацетилированию с помощью ARD1, привёл к стабилизации HIF-1 α и уменьшил взаимодействие с pVHL [Jeong et al., 2002].

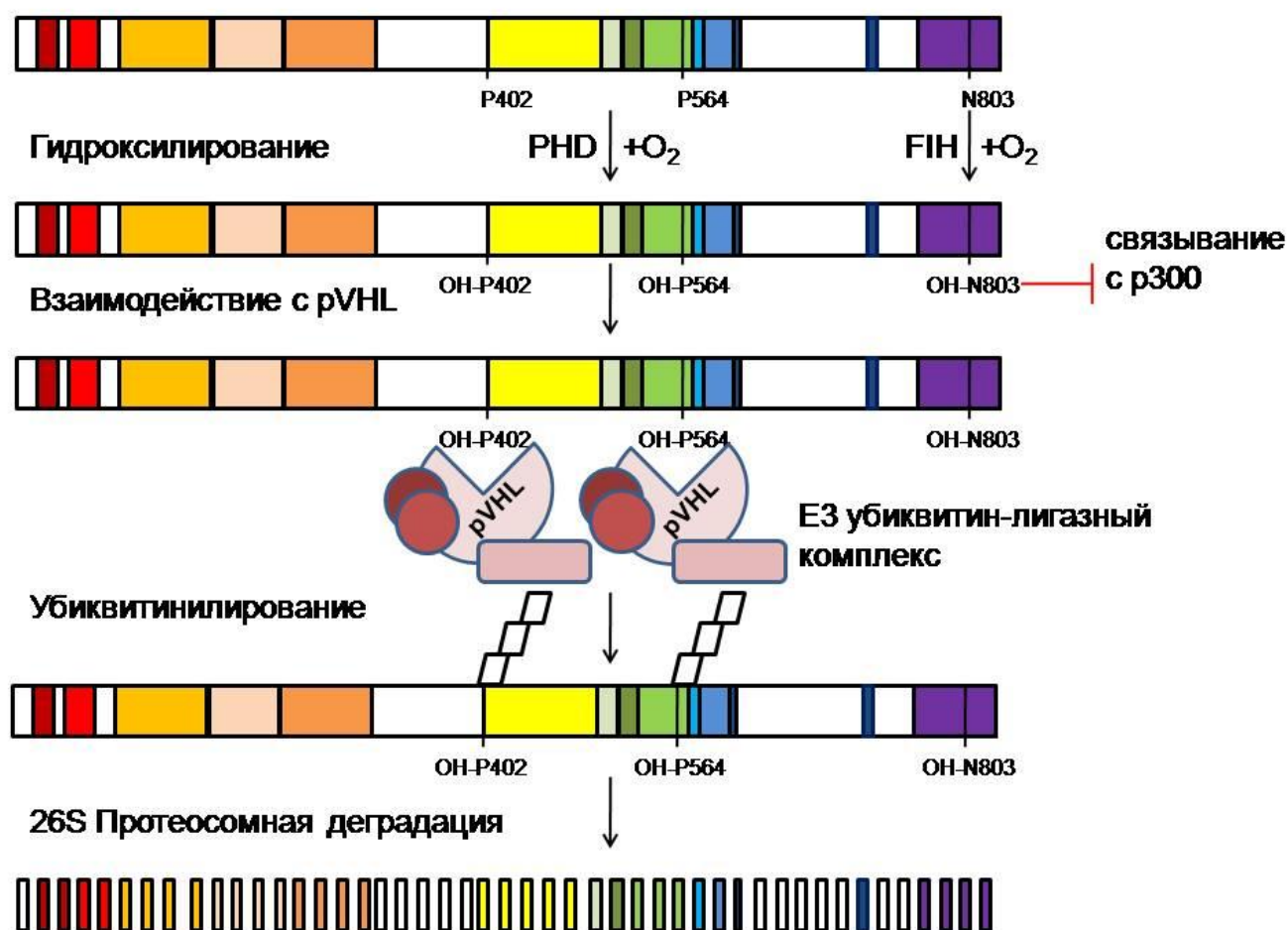


Рис. 1.3. Регуляция стабильности HIF-1 α в условиях нормоксии.

Взаимодействие HIF-1 α с p300 (Рис. 1.4), напротив, нарушается при гидроксировании β атома а.о. N803 [Lando et al., 2002a; McNeil et al., 2002]. Сайт-направленный мутагенез N803A приводил к трансактивации HIF в условиях нормоксии [Lando et al., 2002]. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу а.о. P402, P564 и N803 показали, что замена а.о. Р в ODD приводит к стабилизации HIF-1 α в условиях нормоксии с низкой транскрипционной активностью при нормоксии и высокой – при гипоксии. Замена только а.о. N в C-TAD не повлияла на активность HIF-1 α , поскольку он был нестабилен при нормоксии. Наконец, замена двух а.о. Р и а.о. N приводила к образованию активного HIF-1 α даже в условиях нормоксии [Lando et al., 2002].

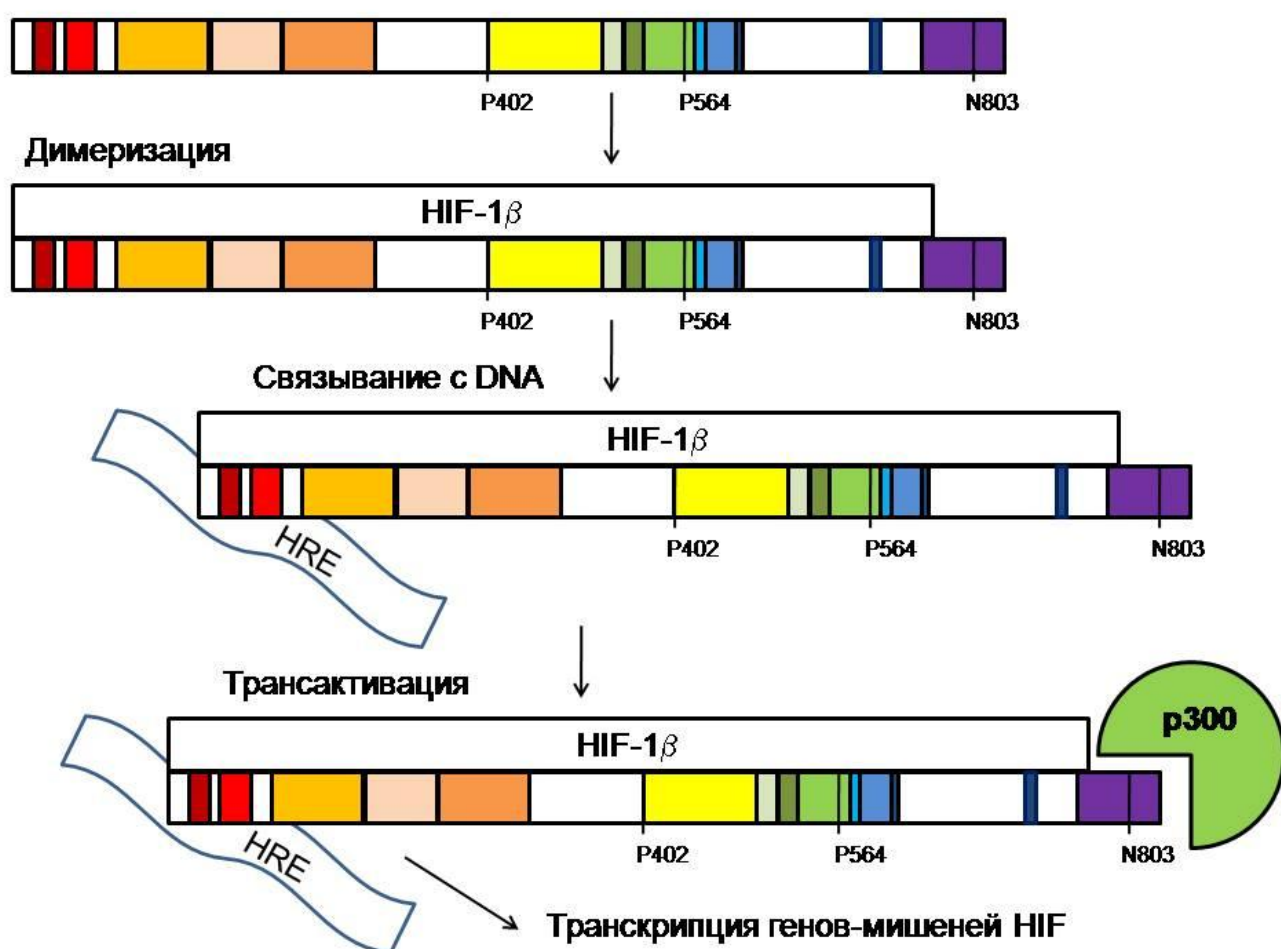


Рис. 1.4. Активация транскрипции после транспорта HIF-1 α в ядро в условиях гипоксии.

Хотя в общих чертах железо- и кислород-зависимое гидроксирование HIF-1 α связывает ответ клеток на дефицит кислорода с дефицитом железа, до сих пор остается ряд нерешённых вопросов, относящихся к тонкостям регуляции этих процессов, например, наличие у гидроксилаз HIF других молекулярных мишеней. На роль мишени претендует железо

регулирующий белок 2 (IRP2), который также гидроксимируется с использованием 2-оксоглутарата, а гипоксия, хелатор железа (дефероксамин – DFO) и аналог 2-оксоглутарата (диметилноксалилглицин) блокируют убиквитинилирование IRP2 [Hanson et al., 2003]. Гидроксилазы HIF характеризуются различной внутриклеточной локализацией: PHD1 выявлена только в ядре, PHD2 – только в цитоплазме, а PHD3 можно обнаружить и в ядре, и в цитоплазме [Metzen et al., 2003]. Все PHD способны гидроксимилировать в HIF-1 α а.о. P564, а P402 – только PHD1 и PHD2 [Semenza, 2001]. Опыты с выключением активности трёх пролил-гидроксилаз (PHD1, PHD2 и PHD3) с помощью siRNA свидетельствуют в пользу ведущей роли PHD2 в регуляции ответа на дефицит кислорода [Verma et al., 2003]. Независимо от уровня гидроксилазной активности HIF взаимодействует с pVHL, привлекающим гистоновую деацетилазу (HDAC), которая влияет на функционирование транскрипционного домена HIF-1 [Mahon et al., 2001].

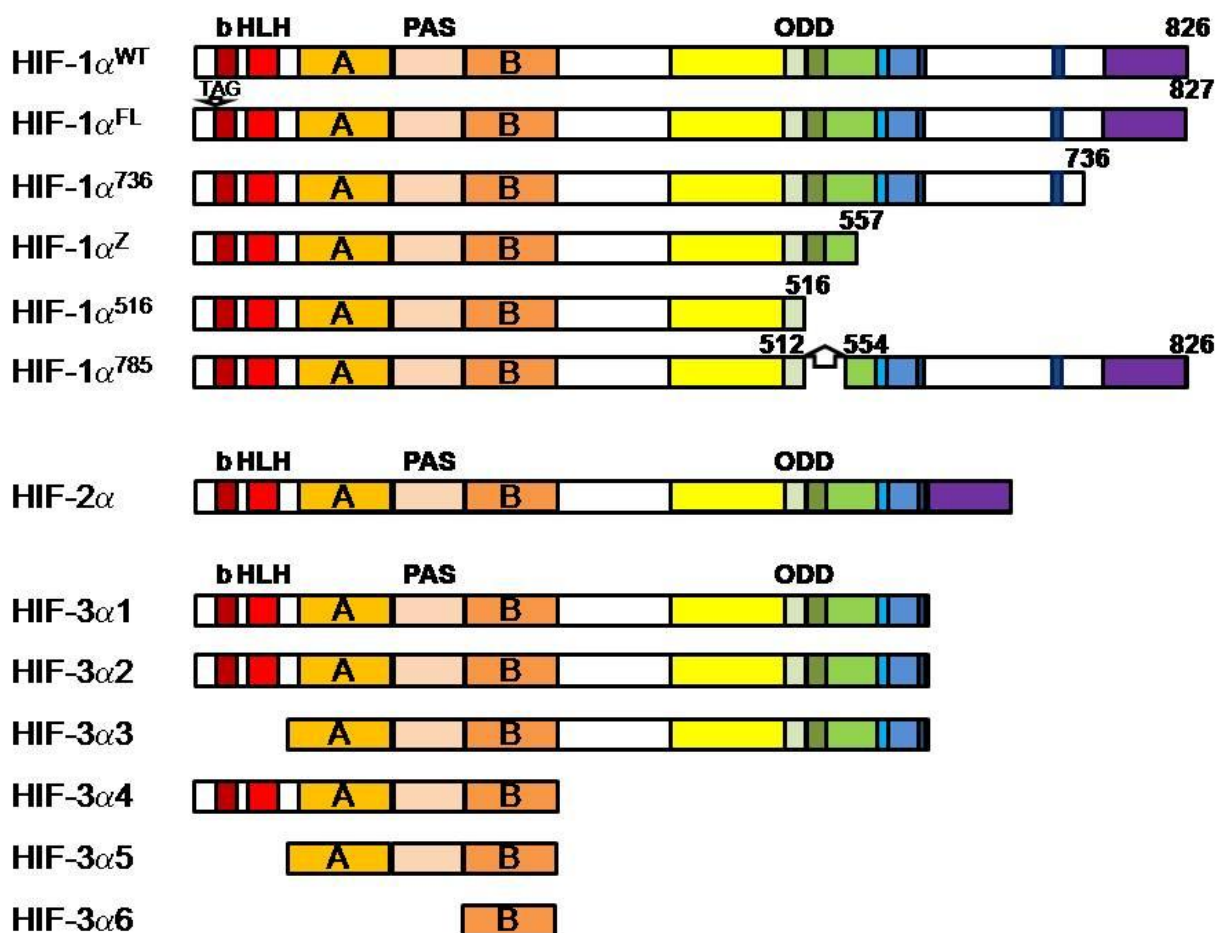


Рис. 1.5. Варианты изоформ HIF- α .

Кроме разнообразия PHD выявлено также несколько вариантов HIF- α и HIF- β [Wang et al., 1995; Gothie et al., 2000], обнаружено несколько сайтов фосфорилирования [Wang et al., 1995]. Учитывая, что транслированные *in vitro* HIF- α и HIF- β менее эффективно димеризуются и взаимодействуют с ДНК по сравнению с субъединицами, полученными из клеток, можно предположить, что посттрансляционные модификации важны для нормального функционирования субъединиц HIF [Jiang et al., 1996].

После открытия HIF-1 α были идентифицированы его гомологи HIF-2 α (эндотелиальный PAS белок – EPAS1, HIF-подобный фактор – HLF, HRF, представитель PAS доменного семейства 2 – MOP2) и HIF-3 α [Tian et al., 1997; Semenza, 2000a; Wenger, 2002]. Было описано пять изоформ HIF-1 α (Рис. 1.5). Изоформа HIF-1 α^{FL} длиннее на один а.о. из-за дополнительного триплета TAG между 1 и 2 экзонам гена HIF-1 α . Изоформа HIF-1 α^{736} не содержит CAT-домена из-за потери экзона 14. Обе изоформы HIF-1 α активируют промотор VEGF при гипоксии [Gothie et al., 2000]. В отличие от них, изоформы HIF-1 α^{557} (HIF-1 α^{Z}) и HIF-1 α^{516} функционируют как доминантные негативные регуляторы HIF-1 α^{WT} . Под действием ионов цинка происходит потеря экзона 12 с образованием HIF-1 α^{Z} , а изоформа HIF-1 α^{516} образуется при потере экзонов 11 и 12 [Chun et al., 2001; Chun et al., 2002]. Изоформа HIF-1 α^{785} содержит все функциональные домены, действует как активатор транскрипции при стимуляции фторбол-12-миристил-13-ацетатом (PMA) и гипертермии в условиях нормоксии. Отличие HIF-1 α^{785} от HIF-1 α^{WT} заключается в потере экзона 11, что вызывает отсутствие части домена ODD, содержащего а.о. K532, ацетилирование которого, как было описано выше, уменьшает стабильность HIF-1 α [Chun et al., 2003].

Подобно HIF-1 α , HIF-2 α также регулируется гидроксигированием консервативных а.о. Р, убиквитинилируется при нормоксии E3 убиквитин-лигазным комплексом и претерпевает протеасомную деградацию [Tanimoto et al., 2001; Masson et al., 2001]. Изоформа HIF-3 α также деградирует за счёт полиубиквитинилирования и протеасомы [Maynard et al., 2003]. В настоящее время описано шесть вариантов этой изоформы (Рис. 1.5). Изоформы HIF-3 α 1-3 содержат домен кислород-зависимой деградации (ODD), включая консенсусный мотив для PHD и присоединения pVHL-E3 убиквитин-лигазного комплекса в условиях нормоксии. Однако HIF-3 α лишены трансактивационного домена. Доминантный негативный регулятор HIF-1, называемый IPAS (inhibitory PAS domain protein), который лишён трансактивационного домена, был идентифицирован как вариант, образующийся в результате альтернативного сплайсинга HIF-3 α [Makino et al., 2002]. Взаимодействие IPAS с HIF-1 α препятствует димеризации HIF-

1 α и HIF-1 β , а образующийся комплекс IPAS/HIF-1 α не связывается с HRE. Таким образом, HIF-3 α (IPAS) действует как антагонист HIF-1 α , препятствуя его транскрипционной активности. Известно, что гипоксия не влияет на уровень mRNA HIF-1 α , HIF-1 β и HIF-2 α , однако уровень mRNA HIF-3 α увеличивается после 2 часов гипоксии [Heidbreder et al., 2003]. В отличие от HIF-3 α , HIF-2 α активирует транскрипцию и индуцирует экспрессию зависимых от гипоксии генов, в том числе VEGF и ЭПО.

Тканеспецифичность экспрессии HIF-2 α и HIF-3 α , ARNT2 и ARNT3, эксперименты на животных с нокаутированными генами HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α и использование комплементарных RNA (siRNA) свидетельствуют в пользу активации ими различных генов-мишеней, а следовательно, различных и более специфичных функций рассматриваемых гомологичных факторов [Iyer et al., 1988; Tian et al., 1998; Wiesener et al., 1998; Semenza, 2000a]. Например, HIF-1 α и HIF-2 α эффективно экспрессируются в почках, однако, только сверхэкспрессия HIF-2 α приводит к усилению пролиферации клеток почечной карциномы [Kondo et al., 2002; Maranchie et al., 2002; Rosenberger et al., 2002]. В случае клеточной линии рака молочной железы HIF-1 α является основной изоформой, необходимой для индукции HIF-зависимых генов [Blancher et al., 2000].

1.3. Гены-мишени HIF

Первоначально HIF-1 был идентифицирован как регулятор синтеза ЭПО, который реализует отрицательную обратную связь между количеством кислорода, поступающим в почки, и кислород-транспортной функцией крови, связанной с эритропозом в красном костном мозге [Wang and Semenza, 2003; Semenza, 1994]. Однако затем эта кислород-чувствительная система была обнаружена в различных типах клеток практически всех представителей Подцарства многоклеточных животных (*Metazoa*), что подтверждает центральную роль кислорода во множестве биохимических процессов, в том числе для функционирования дыхательной цепи митохондрий [Maxwell et al., 1993].

Следует ожидать, что система, отвечающая за такой важный для жизни элемент, должна быть относительно пластичной, то есть последствия активации HIF должны отличаться в различных типах клеток. Так, например, синтез ЭПО относительно специфичен для фибробластов почек, звёздчатых клеток печени и гепатоцитов [Maxwell and Ratcliffe, 1996].

Таблица 1.3. Связь активации генов-мишеней HIF и процессов адаптации к гипоксии.

Процесс на уровне организма	Тканевой и клеточный уровень	Ген-мишень HIF	Ссылка
Сердечно-сосудистая система	Ангиогенез	VEGF Рецептор VEGF Ингибитор активатора плазминогена 1 Трансформирующий ростовой фактор $\beta 3$	Bunn and Poyton, 1996 Forsythe et al., 1996 Gerber et al., 1997 Kietzmann et al., 1997 Caniggia et al., 2000 Gordano and Jonson, 2001
	Вазомоторный контроль	NO синтаза 2 (iNOS) Эндотелин-1 Гем-оксигеназа 1 α_{1B} -адренэргический рецептор Адреномедуллин	Melillo et al., 1995 Hu et al., 1998 Lee et al., 1997 Eckhart et al., 1997 Palmer et al., 1998 Cormier-Regard et al., 1998
Созревание эритроцитов	Эритропоэз	ЭПО	Wang and Semenza, 1993
	Транспорт железа	Трансферрин Рецептор трансферрина ЦП	Rolfs et al., 1997 Tacchini et al., 1999 Mukhopadhyay et al., 2000
Энергетический метаболизм	Гликолиз и транспорт глюкозы	Лактатдегидрогеназа А Фосфоглицерат киназа 1 Альдолаза А и С Фосфофруктокиназа L Пируваткиназа М Энолаза 1 Гексокиназа 1 и 2 Глицеральдегид-3-фосфата дегидрогеназа Транспортёр глюкозы 1 и 3	Firth et al., 1994; Semenza et al., 1994 Semenza et al., 1996 Iyer et al., 1998 Lu et al., 2002 Gleadle and Ratcliffe, 1997 O'Rourke et al., 1996
Рост и выживание клеток	Арест клеточного цикла и апоптоз	p21 Bcl2/E1B 19 кДа-связывающий белок 3 Nip3-подобный белок X	Carmeliet et al., 1998 Bruick, 2000 Sowter et al., 2001
	Ростовые факторы	Инсулин-подобный ростовой фактор 1 Трансформирующий ростовой фактор α Белки, связывающие инсулин-подобный ростовой фактор 1, 2 и 3	Feldser et al., 1999 Krishnamachary et al., 2003
	Регуляция pH	Карбоновая ангидраза 9	Wykoff et al., 2000
Метаболизм	Обмен нуклеотидов	Аденилат киназа 3	O'Rourke et al., 1996
	Обмен аминокислот	Тирозингидроксилаза Трансглутаминаза 2	Norris and Millhorn, 1995
	Синтез матрикса	Коллаген пролил-4-гидроксилаза $\alpha 1$	Takahashi et al., 2000

Гены-мишени HIF вовлечены в регуляцию транспорта/метаболизма железа и глюкозы, ангиогенеза, апоптоза и других важных для адаптации к гипоксии процессов, которые суммированы в таблице 1.3 [Semenza et al., 1994]. В частности железо, как и кислород, является жизненно важным элементом, фактором, лимитирующим рост клеток и экспрессию ряда генов. Логично, что гидроксилазы HIF, выступающие в качестве сенсоров кислорода, зависимы от внутриклеточного пула железа. То есть дефицит железа снижает активность гидроксилаз и вызывает стабилизацию HIF.

Известно, что обработка ЭПО развивающихся эритроидных клеток стимулирует запасание железа, которое используется для синтеза гемоглобина и запасается в цитоплазме в составе ферритина [Adamson, 1996]. При гипоксии увеличивается экспрессия трансферрина и его рецептора, что обеспечивает запасание железа клетками [Lok and Ponka, 1999]. Под контролем HIF находится также ген церулоплазмينا (ЦП, ферро:O₂-оксидоредуктаза), продукт которого способствует встраиванию железа в трансферрин. Без катализируемого ЦП окисления Fe²⁺ до Fe³⁺ затруднён транспорт железа в клетки и его отток из депо.

На клеточном уровне уменьшение парциального давления кислорода (гипоксия) приводит к активации альтернативных, кислород-независимых метаболических путей. Поскольку получение энергии из жирных кислот и аминокислот невозможно без участия кислорода, происходит переключение метаболизма на анаэробный гликолиз, что обусловлено индукцией синтеза ферментов гликолиза и транспортёров глюкозы [Dang and Semenza, 1999]. Гликолиз обеспечивает синтез только 2 молекул АТФ из 1 молекулы глюкозы, в отличие от цикла Кребса, обеспечивающего синтез 38 молекул АТФ. Увеличенная продукция лактата при гликолизе приводит к уменьшению рН среды. Дополнительно экспрессируется ряд стрессорных белков, отвечающих за выживание клетки в кислой среде (трансмембранная карбоновая ангидраза) либо за апоптоз. Увеличение скорости гликолиза является нормальным ответом на усиление пролиферации, так, например, мигрирующие клетки используют этот путь для получения энергии [Mazurek et al., 1997]. Промежуточные метаболиты гликолиза являются предшественниками синтеза глицина, серина, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, фосфолипидов, все они важны для роста клеток и их выживания при стрессе [Harris, 2002].

Дальнейшая адаптация на тканевом и системном уровне реализуется за счёт увеличения транспорта кислорода. Так, помимо эритропоэза, стимулируется вентиляция легких и ангиогенез за счёт VEGF, который специфически взаимодействует с рецептором на эндотелиальных клетках, влияет на их привлечение в лишённый сосудов гипоксический участок ткани и стимулирует пролиферацию с образованием сосудов [Neufeld et al., 1999; An et

al., 2000; Josco et al., 2000; Giordano and Johnson, 2001]. Индукция ангиогенеза приводит к увеличению плотности сосудистой сети, а значит, сокращается дистанция для диффузии кислорода к тканям. Однако локальный кровоток при патологических условиях также контролируется путём модуляции сосудистого тона за счёт продукции NO (iNOS), CO (гем-оксигеназа 1), эндотелина 1, адреномедулина либо активации α_{1B} -адренэргических рецепторов, находящихся под контролем HIF (Таблица 1.3).

1.4. Миметики гипоксии: кобальт, никель и хелаторы железа

В ряде работ было показано, что добавление солей никеля либо кобальта в культуральную среду вызывает фенотипические изменения клеток, подобные гипоксическому ответу [Brahmachari and Joseph, 1973; Salnikow et al., 1999; Salnikow et al., 2000a]. Было показано, что инъекция сульфида никеля (Ni_2S_3) в почки крыс вызывает выраженный и длительный эритроцитоз [Jasmin and Solymoss, 1975; Morse et al., 1977]. При этом увеличение количества эритроцитов сопровождалось увеличением концентрации ЭПО. Такой же эффект был получен при внутрибрюшинной инъекции крысам хлорида никеля либо хлорида кобальта [Oskarsson et al., 1981]. В экспериментах *in vitro* культивирование клеток при пониженной концентрации кислорода либо в присутствии солей кобальта или никеля вызывало дозо-зависимое увеличение mRNA мишеней HIF: ЭПО и VEGF [Goldberg et al., 1988; Namiki et al., 1995], а также стабилизацию HIF-1 α [Salnikow et al., 1999]. Была высказана гипотеза, что индукция синтеза ЭПО ионами металлов переменной валентности – кобальта и никеля – вызвана замещением иона железа в молекуле «сенсора кислорода» [Goldberg et al., 1988]. Связывание HIF-1 с ДНК индуцируется как при гипоксии, так и при добавлении хлорида кобальта в среду, что было использовано для препаративного выделения HIF-1 α из экстракта ядер [Wang and Semenza, 1995]. Описанные выше свойства солей никеля и кобальта быть миметиками гипоксии в литературе также называют химической или металл-индуцированной гипоксией. Индукция гипоксия-подобного эффекта была обнаружена при появлении в 1950-х годах на рынке США кобальт-содержащего препарата под названием «Roncovite». Это лекарство использовалось для лечения анемии у взрослых и детей, однако было запрещено вследствие высокой почечной токсичности. Тем не менее, различные пищевые добавки, содержащие, как правило, глюконат кобальта доступны в настоящее время.

Элементы железо, кобальт и никель относятся к VIII группе периодической системы элементов, имеют атомные номера 26, 27, 28 и характеризуются весьма близкими ионными радиусами: 0,77; 0,72 и 0,69 Å соответственно. Это позволяет предположить их

взаимозаменяемость в металл-связывающих сайтах ферментов, что было подтверждено в экспериментах по «отравлению» двухвалентными металлами фталат диоксигеназы, которая содержит два железо-связывающих сайта. Так, железо-серный кластер Риске [2Fe-2S] выступает в качестве электрон-передающего кофактора, а одноядерный сайт – как сайт окисления субстрата, подобный PHD [Batie and Ballou, 1990]. Любой из двухвалентных ионов, Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} либо Zn^{2+} , может связываться в одноядерном сайте фермента, но только ион железа обеспечивает реакцию гидроксирования [Batie et al., 1987]. Другим объяснением эффекта ионов кобальта и никеля может быть их более прочное связывание с мембранным транспортёром двухвалентных ионов металлов (DMT1) по сравнению с закисным железом, что вызывает снижение концентрации внутриклеточного железа. Действительно, транспортирующая способность для ионов никеля в ооцитах, экспрессирующих DMT1, гораздо ниже по сравнению с железом [Gunshin et al., 1997]. Этот эффект обусловлен большей константой связывания и меньшей скоростью обмена для ионов никеля по сравнению с ионами железа. В целом скорость обмена иона металла между лигандами коррелирует со скоростью обмена воды, которая для Ni^{2+} примерно в 100 раз ниже по сравнению с Fe^{2+} . Так, независимо от термодинамической константы образования комплекса обмен никеля происходит примерно в 100 раз медленнее, чем обмен железа. Аналогичные характеристики были получены и для ионов кобальта по сравнению с ионами железа [Williams, 1972]. Таким образом, ионы кобальта и никеля могут связываться с DMT1 и блокировать доступность ионов закисного железа для клеток, что приводит к снижению пула внутриклеточного железа. Действительно, соли кобальта и особенно никеля сильно ингибируют всасывание железа клетками тонкого кишечника, экспрессирующими DMT1 [Smith et al., 2002]. Кроме того, когда никель транспортируется внутрь клетки, он может связываться с апо-формами белков и вследствие низкой скорости обмена препятствовать связыванию с этими белками железа. Гипотеза о том, что кобальт и никель являются миметиками гипоксии, interfering с метаболизмом железа, подтверждается тем фактом, что многие хелаторы железа, например DFO, эффективно стабилизируют HIF [Wang and Semenza, 1993b].

Дополнительный механизм стабилизации HIF кобальтом может быть обусловлен способностью HIF-2 α связывать ионы Co^{2+} и тем, что кобальт-связывающий сайт перекрывается с сайтом связывания pVHL [Yuan et al., 2001]. Таким образом, ионы кобальта могут препятствовать взаимодействию pVHL с гидроксированным HIF-2 α , хотя это не исключает прямого влияния на ферменты PHD, вызывающие гидроксирование HIF-2 α , что также препятствует взаимодействию с pVHL [Yuan et al., 2003]. Наконец, влияние ионов никеля и кобальта на стабилизацию HIF может быть также обусловлено прямым либо опосредованным

действием на баланс аскорбата, который необходим для нормального функционирования гидроксилаз HIF [Salnikow et al., 2000]. Так, прямое взаимодействие ионов кобальта и никеля с аскорбатом препятствует его транспорту в клетку, вызывая дефицит внутриклеточного витамина С. Кроме того, Co^{2+} и Ni^{2+} индуцируют образование активных форм кислорода, окисляющих аскорбат.

В 1990 году Международное Агентство Изучения Рака (IARC) признало никель канцерогеном [Kasprzak et al., 2003]. Этому предшествовали наблюдения о повышенной частоте рака легких и почек у добывающих и перерабатывающих никель работников [Doll et al., 1970], а также канцерогенности соединений никеля при испытаниях на животных [Sunderman, 1984]. Канцерогенный потенциал соединений кобальта был признан IARC в 1991 году, хотя было сделано заключение о неадекватности данных о канцерогенности для человека, но достаточности доказательств, полученных в экспериментах на лабораторных животных [Lison et al., 2001]. Хотя кобальт является важным элементом, входящим в состав витамина B12, его токсичность выше, чем у никеля, вследствие индукции выраженного окислительного стресса, разрывов цепей ДНК, а также ингибирования репарации ДНК [Salnikow et al., 2000; Lison et al., 2001]. Связь кобальта и никеля с канцерогенезом можно объяснить и как следствие стабилизации HIF, поскольку она характерна для всех типов опухолевых клеток, а HIF является ключевой мишенью для онкотерапии [Maxwell et al., 2001; Semenza, 2003]. Гипоксия является основной особенностью солидных опухолей и ассоциирована с наиболее плачевными клиническими последствиями их роста. Вследствие очевидных адаптивных последствий активация HIF должна способствовать росту опухолевых клеток наряду с увеличением ангиогенеза вокруг опухоли и скорости гликолиза внутри неё. Так, выявление HIF- α с помощью иммунохимических методов позволяет отличить солидную опухоль от окружающих тканей, а генетические исследования показывают, что потеря субъединиц HIF значительно снижает васкуляризацию и опухолевый рост [Maxwell et al., 1997; Chen et al., 2003].

Наиболее интересным связующим звеном между HIF и онкогенезом является упоминавшийся ранее опухолевый супрессор pVHL [Maxwell et al., 1999]. Врождённые мутации в гене VHL приводят к повышенному риску развития (~70%) карциномы почек (clear cell renal cell carcinoma – CCRCC) вследствие функционального дефекта аллеля дикого типа из-за соматической мутации либо гиперметиличирования [Kaelin and Maher, 1998]. Более того, потеря функции двух аллелей с высокой вероятностью обнаруживается при спорадических формах CCRCC. Доказательством того, что функциональный дефект pVHL связан с активацией HIF и развитием CCRCC, является то, что трансфекция CCRCC клеток конструкцией, кодирующей pVHL, вызывала супрессию роста клеток, а мутация HIF- α в сайте гидроксилирования либо

блокирование взаимодействия с pVHL, напротив, восстанавливали рост опухолевых клеток [Kondo et al., 2002; Maranchie et al., 2002].

Миметиками гипоксии также являются хелаторы железа, подавляющие активность PHD и FIH: DFO, деферазирокс (ICL670) и деферипрон (L_1), эпигаллокатехин-3-галлат и ряд других хелаторов, структурные формулы которых приведены на рис. 1.6. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что хелаторы железа вызывают стабилизацию HIF-1 α и индукцию его генов-мишеней, например, ЭПО [Wu et al., 2010; Baek et al., 2011]. Хелаторы используют в терапии для удаления избыточных количеств железа из тканей в случае гемосидероза, ацерулоплазминемии, многократных переливаний крови при бета-талесемии и нейродегенеративных заболеваний [Barton, 2007; Brissot et al., 2008; Skidmore et al., 2008; Shah et al., 2012; Suzuki et al., 2013].

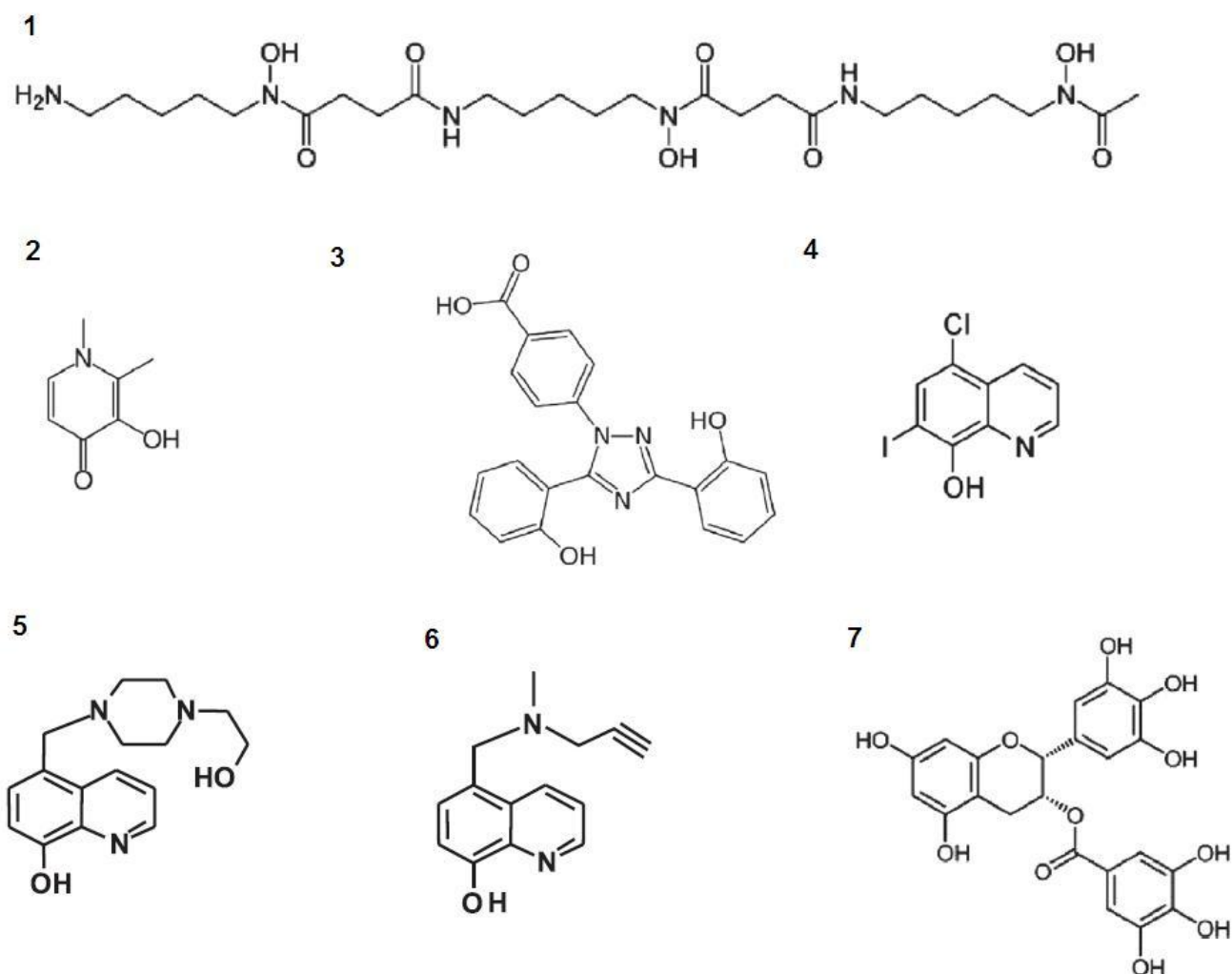


Рис. 1.6. Структурные формулы хелаторов железа: 1 – дефероксамин (DFO), 2 – деферипрона (L_1), 3 – деферазирокса (ICL670), 4 – 5-хлор-7-иод-8-гидроксихинолина (клиохинол), 5 – VK28, 6 – M30, 7 – (-)-эпигаллокатехин-3-галлата.

Хелаторы, используемые для терапии, должны отличаться способностью проникать через клеточные мембраны, в том числе через гематоэнцефалический барьер, связывать железо в участках его накопления и выводить избыток в плазму без заметного влияния на насыщение железом трансферрина [Boddaert et al., 2007; Ward et al., 2015]. В последние годы терапия хелаторами нейродегенеративных заболеваний рассматривается как перспективный подход, связанный как с выведением избыточных количеств железа из ЦНС, так и с HIF-зависимой активацией синтеза ЭПО, для которого показаны нейропротективные свойства. Взаимосвязь накопления железа в ЦНС с развитием нейродегенерации удобно рассмотреть на примере болезни Паркинсона [Weinreb et al., 2013], основным патогенетическим фактором развития которой является накопление и агрегация α -синуклеина. Агрегаты α -синуклеина, формирующие патогномичные структуры в ЦНС – тельца Леви, способствуют накоплению в них редокс-активного железа в ходе развития болезни Паркинсона [Hirsch et al., 1991]. Редокс-активное железо способствует дальнейшей агрегации α -синуклеина и митохондриальной дисфункции дофаминэргических нейронов [Martin et al., 2003]. Избыток α -синуклеина увеличивает накопление Fe^{2+} в нейронах, что приводит к образованию АФК и гибели нейронов [Chew et al., 2010]. На молекулярном уровне железо взаимодействует с α -синуклеином, во-первых, увеличивая трансляцию за счёт взаимодействия IRE-ВР с 5'-нетранслируемой областью mRNA α -синуклеина [Friedlich et al., 2007], во-вторых, вызывая аномальный фолдинг белка и формирование агрегатов при прямом взаимодействии [Binolfi et al., 2006; Kostka et al., 2008]. Образующийся порочный круг обусловлен также ферриредуктазной ферментативной активностью α -синуклеина, которая способствует активации PHD и FIH, а следовательно уменьшению HIF-зависимого ответа, способствующего выживанию нейронов [Davies et al., 2011]. Описанные патологические события купируются при использовании хелаторов железа при доклинических исследованиях с использованием DFO, деферипрона, деферазирокса, оказывающих протективный эффект при повреждении дофаминэргических нейронов железом, 6-гидроксидофамином либо MPTP [Ben-Shachar et al., 1991; Lan and Jiang, 1997, Molina-Holgado et al., 2008; Dexter et al., 2011]. Клиохинол (CQ) и его аналог PBT434 снижают нейродегенерацию, вызванную MPTP либо 6-гидроксидофамином, у мышей, в том числе у животных с моделью болезни Паркинсона, трансгенных по мутации A53T α -синуклеина [Kang et al., 2003; Chereny et al., 2011]. Наконец, хелатор железа растительного происхождения, (-)-эпигаллокатехин-3-галлат, содержащийся в зелёном чае, снижает риск нейродегенерации, развития болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера [Checkoway et al., 2002; Kuriyama et al., 2006; Ng et al., 2008; Tan et al., 2008]. Помимо ингибирования активности PHD и FIH хелаторы

железа могут влиять на стабильность HIF-2 α на уровне трансляции за счёт связывания IRE-ВР с 5'-нетранслируемой областью mRNA HIF-2 α [Sanchez et al., 2007; Zimmer et al., 2008].

1.5. Регуляция гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) активными формами кислорода.

Несмотря на детальное описание механизмов регуляции активности HIF гидроксилазами, некоторые данные противоречат упрощённой кислород-зависимой регуляции HIF. Например, пролилгидроксилазы коллагена активны при гипоксии, а максимальная стабилизация HIF-1 α наблюдается при 0,5% O₂, но не при аноксии, что позволяет предположить наличие дополнительных механизмов, регулирующих стабильность HIF-1 α [Jiang et al., 1996]. В литературе дебатированы две противоположные модели участия активных форм кислорода (АФК) в регуляции стабильности HIF-1 α [Semenza, 2000; Michiels et al., 2002].

Первая модель постулирует постоянное восстановление кислорода NADPH-оксидазой до супероксидного анион-радикала, который превращается в пероксид водорода с помощью супероксиддисмутазы. Согласно этой модели уменьшение концентрации молекулярного кислорода приведёт к уменьшению уровня АФК, в таком случае уменьшение генерации АФК должно быть прямым либо опосредованным механизмом стабилизации HIF-1 α (Рис. 1.7).

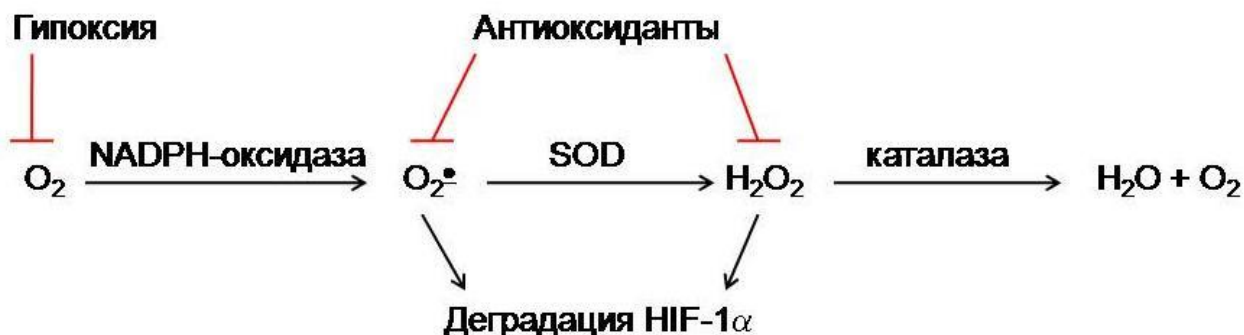


Рис. 1.7. Модель АФК-зависимой регуляции стабильности HIF-1 α : гипоксия препятствует генерации АФК. SOD – супероксиддисмутаза.

Экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу: в условиях гипоксии уменьшается продукция АФК; в условиях гипоксии под действием эндогенного пероксида водорода наблюдается супрессия генов-мишеней HIF-1; в клетках существует немитохондриальная цитохром *b*-содержащая NADPH-оксидаза, которая может отвечать на уровень кислорода [Michiels et al., 2002]; гены-мишени HIF-1 индуцируются в присутствии

эндогенной каталазы либо антиоксидантов [Salceda and Caro, 1997] , можно наблюдать продолжительную активацию HIF-1 в клетках с дефицитом gp91 phox субъединицы NADPH-оксидазы [Archer et al., 1999]. Однако некоторые наблюдения противоречат этой гипотезе. Так, неспецифический ингибитор NADPH-оксидаз (дифенилен иодоний, DPI) блокирует активацию HIF-1 в ответ на гипоксию [Gleadle et al., 1995]. Более того, некоторые эксперименты свидетельствуют о том, что при гипоксии продукция АФК скорее усиливается, чем понижается [Chandel et al., 1998].

Вторая модель предполагает диаметрально противоположную схему, базируясь на идее, что при гипоксии усиливается продукция АФК митохондриями (Рис. 1.8), что вызывает стабилизацию HIF-1 α . Согласно этой модели в условиях гипоксии утилизация кислорода цитохром *c* оксидазой (митохондриальный комплекс IV) уменьшается и электроны накапливаются в предшествующих дыхательных комплексах. Это приводит к тому, что комплекс III увеличивает генерацию АФК.

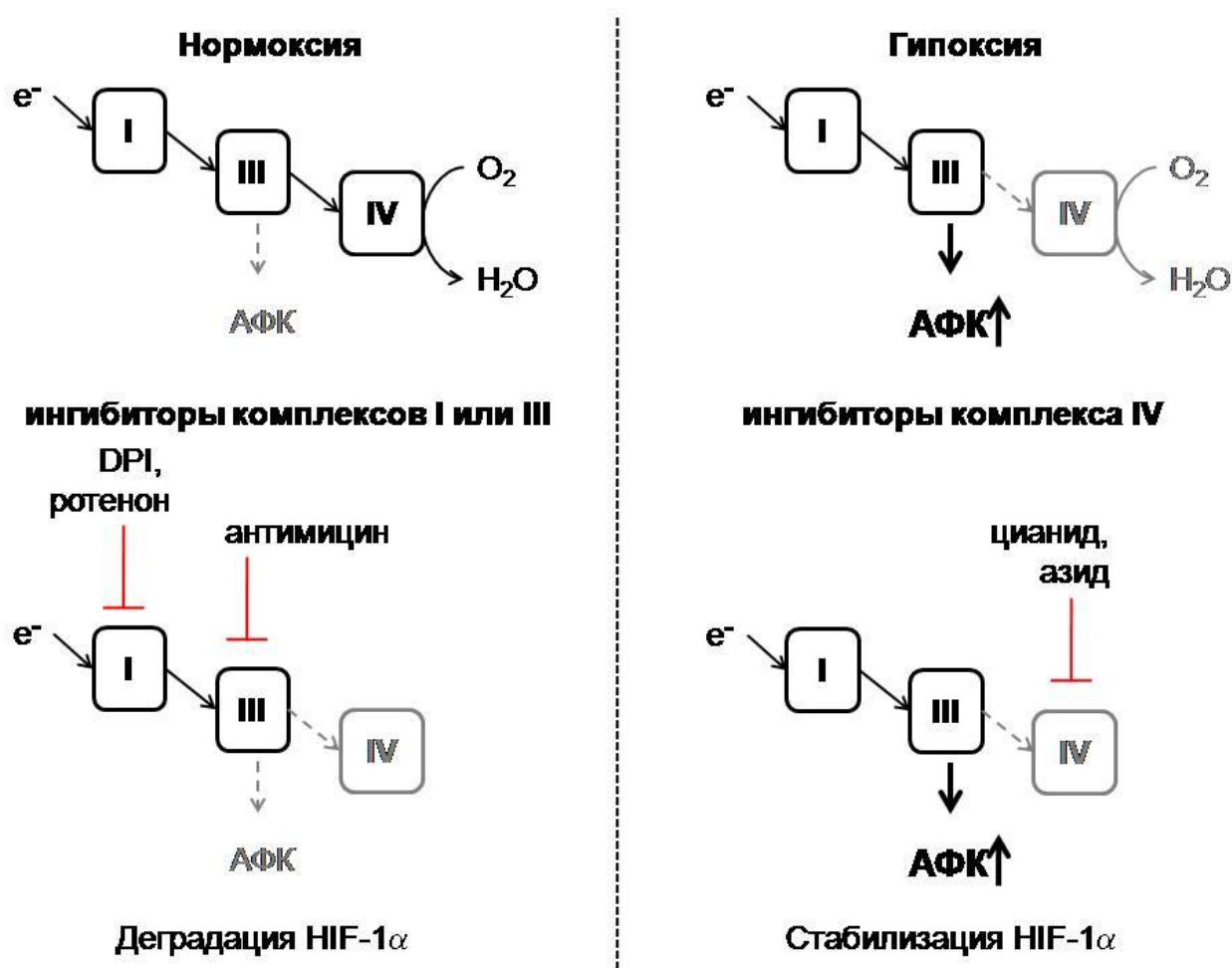


Рис. 1.8. Модель АФК-зависимой регуляции стабильности HIF-1 α : гипоксия способствует генерации АФК.

В поддержку этой теории выступают данные о том, что ингибиторы комплексов I и III блокируют индукцию HIF-1 в условиях гипоксии вследствие ингибирования продукции АФК, а ингибиторы комплекса IV способны индуцировать HIF-1 при нормоксии вследствие генерации АФК [Chandel et al., 1998]. Ещё одно доказательство того, что митохондриальный комплекс III может выступать в качестве «сенсора» кислорода, было получено на ρ^0 Нер3В клетках, лишённых функционирующей дыхательной цепи, в которых не происходит индукция HIF-1 при гипоксии [Chandel et al., 1998]. Субстрат дыхательного комплекса II, сукцинат, восполняет ответ на гипоксию в клетках с дефектом комплекса I [Agani et al., 2000]. Наконец, сверхэкспрессия супероксиддисмутазы, приводящая к увеличению продукции пероксида водорода, индуцирует HIF-1-зависимый синтез VEGF [Grzenkiewicz-Wydra et al., 2004]. Следует, однако, отметить, что эта модель не подтвердилась, когда ρ^0 клетки культивировали при жёстких гипоксических условиях (0,1% O_2) [Vaughan et al., 2001], в присутствии хлорида кобальта либо DFO вместо гипоксии [Chandel et al., 1998]. Эти различия можно объяснить различными механизмами детекции кислорода клеткой в случае аноксии и гипоксии.

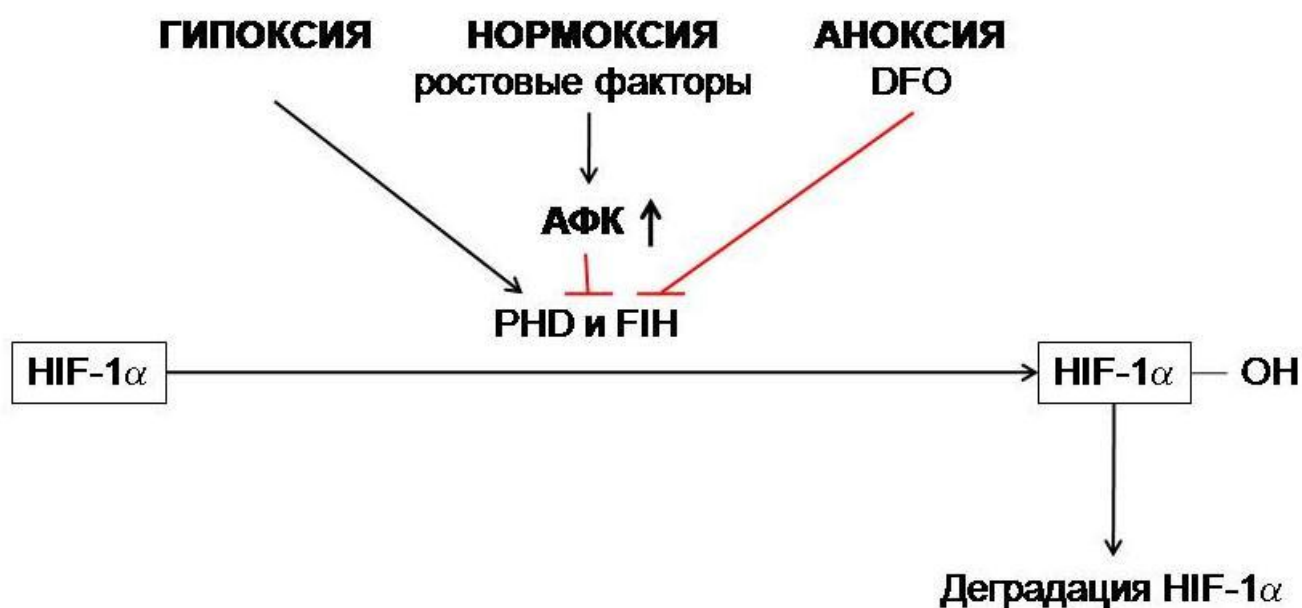


Рис. 1.9. Роль гидроксилаз HIF (PHD и FIH) как прямых (аноксия) и косвенных (гипоксия) «сенсоров» кислорода.

Гидроксилазы HIF, использующие молекулярный кислород в качестве субстрата, выступают в качестве прямых «сенсоров» при полном его отсутствии [Schroedl et al., 2002]. Хлорид кобальта и DFO действуют также напрямую, как ингибиторы этих ферментов, а значит, их можно приравнять к аноксии, когда стабилизация HIF-1α не зависит от продукции АФК и функционирование электрон-транспортной цепи митохондрий не имеет значения. Эта гипотеза

объясняет: почему ингибиторы комплекса I препятствуют гипоксия-индуцированной, но не DFO- или аноксия-индуцированной стабилизации HIF-1 α [Schroedl et al., 2002]. Напротив, при гипоксической стабилизации HIF-1 α требуются дополнительные сигнальные системы, включающие фосфорилирование и продукцию АФК (Рис. 1.9). Сохранение гипоксия-индуцируемой стабилизации HIF-1 α в клетках с дефектом электрон-транспортной цепи [Vaux et al., 2001] могло происходить вследствие незначительной активности комплексов I и III, достаточной для генерации АФК, либо скорее при аноксических, чем при гипоксических условиях (0,1% O₂) эксперимента.

1.6. Кислород-независимая регуляция гипоксия-индуцибельного фактора (HIF).

Первичные данные об активации HIF свидетельствовали в пользу участия процессов фосфорилирования белков, которые могут быть опосредованы различными протеинкиназами (Wang et al., 1995). Во-первых, HIF-1 α может фосфорилироваться с участием p42/p44 (Erk2/Erk1) митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), хотя при этом транскрипционный фактор активируется, но не стабилизируется [Richard et al., 1999]. В этом случае ростовые факторы модифицируют функции HIF-1, действуя на последовательность: рецепторные тирозинкиназы, Ras/Raf, MEK (митоген-активируемые киназы киназ), МАРК-путь [Wenger, 2002]. Во-вторых, активация HIF-1 может включать последовательность: рецепторные тирозинкиназы, PI3K (фосфатидилинозитол-3 киназы), пролил-4-гидроксилазы (протеинкиназа В), FRAP-путь (FKBP-рапамицин ассоциированный белок). Ряд исследований показывают, что ингибирование PI3K либо АКТ киназ ослабляет экспрессию генов-мишеней HIF-1. Более того, потеря активности PTEN (делеция фосфатазы и гомолога тензина на хромосоме 10), который является опухолевым супрессором и отрицательным регулятором PI3K, приводит к увеличению экспрессии HIF-1 α [Zundel et al., 2000; Fukuda et al., 2002]. Наконец, FRAP может стимулировать экспрессию HIF-1 α даже в условиях нормоксии [Zhong et al., 2000]. Ингибирование АФК-зависимого p38 MAP киназного пути приводит к ингибированию активности HIF-1 [Gorlach et al., 2001].

Помимо опухолевого супрессора pVHL в регуляции HIF-1 участвует также p53. При гипоксических условиях оба белка стабилизируются, для реализации их транскрипционной активности требуется участие коактиватора p300. При нормоксических условиях p53, подобно HIF-1 α , убиквитинилируется E3 лигазой с участием MDM2 и деградирует в 26S протеасоме [Giaccia and Kastan, 1998]. Потеря активности p53 при гипоксии приводит к усиленной стабилизации HIF-1 α , что объясняется прямым взаимодействием p53 и HIF-1 α , вызывающим

MDM2-опосредованное убиквитинилирование HIF-1 α [Ravi et al., 2000]. В условиях пролонгированной аноксии p53 выступает в качестве негативного регулятора HIF-1 α : ингибирует HIF-1, конкурируя за связывание с p300 [Schmid et al., 2003], и, как было сказано выше, способствует деградации HIF-1 α за счёт прямого взаимодействия [Ravi et al., 2000]. Это объясняет усиление ангиогенеза в случае опухолевого роста, опосредованного мутациями p53.

1.7. Лактоферрин – физико-химические свойства, функции, связь с метаболизмом железа.

Лактоферрин (ЛФ) был впервые выделен из молока коров в 1939 году и первоначально получил название «красный белок молока» [Sorensen and Sorensen, 1939]. В 1960 году ЛФ был независимо выделен в трёх лабораториях как основной железо-связывающий белок грудного молока [Groves, 1960; Johanson, 1960; Montreuil et al., 1960]. В последующих публикациях ЛФ нередко называют лактосидерофилином и лактотрансферрином. Последнее название обусловлено значительной гомологией первичной структуры ЛФ и сывороточного трансферрина, что позволяет отнести их к одному семейству [Metz-Boutigue *et al.*, 1984]. Помимо грудного молока (1-4 мг/мл) и молозива (7 мг/мл) ЛФ обнаружен в меньшей концентрации в таких экзокринных секретах, как слёзная жидкость (1 мг/мл), семенная жидкость (1 мг/мл), бронхиальная слизь (1 мг/мл), цервикальная слизь (370 мкг/мл) и слюна (достигает концентрации 14 мг/мл при паротите, в норме – 10-32 мкг/мл). В норме вследствие незначительной дегрануляции секреторных гранул нейтрофилов ЛФ определяется в плазме крови (0.4-2 мкг/мл), однако при сепсисе концентрация ЛФ повышается до 200 мкг/мл [Masson, 1970; Bennet and Kokocinski, 1978; Maaks *et al.*, 1989; Iyer and Lonnerdal, 1993]. Удельное содержание ЛФ в нейтрофилах крыс и мышей меньше, чем в нейтрофилах человека [Teng, 2002]. В грудном молоке лишь небольшая часть ЛФ насыщена железом (6-8%), а более 90% белка обычно находится в апо-форме [Fransson and Lonnerdal, 1980]. То же относится к ЛФ нейтрофилов, насыщение которого железом не превышает 10% [Bezwoda and Mansoor, 1989]. Тот факт, что ЛФ, получаемый с помощью методов генной инженерии из молока трансгенных мышей, полностью либо как минимум на 50% насыщен железом [Nuijens et al., 1997; Соколов и соавт., 2006], позволяет предположить, что одна из ведущих функций ЛФ *in vivo* заключается в связывании свободных ионов железа. Следует отметить, что в молоке крыс и мышей содержатся значительно меньшие количества ЛФ: 0.2-2 мг/мл у мышей и менее 50 мкг/мл у крыс. При этом, если в грудном молоке концентрация ЛФ составляет менее 50 мкг/мл, то в молоке крыс и мышей она достигает 2 мг/мл [Masson and Heremans, 1971].

Молекула ЛФ состоит из 691 а.о. и связывает два иона железа с помощью *N*-доли (1-333 а.о.) и *C*-доли (344-691 а.о.), соединённых альфа-спиральным участком (334-344 а.о.). Последний в молекуле сывороточного трансферрина обогащён а.о. пролина и не имеет упорядоченной структуры. Поскольку а.о., лигандирующие железо в ЛФ и трансферрине, идентичны, вероятно, отмеченное выше структурное различие участка, соединяющего доли, определяет принципиальное отличие железо-связывающей способности белков, выражающееся в большей устойчивости комплекса ЛФ с железом к уменьшению рН среды по сравнению с трансферрином сыворотки [Baker *et al.*, 1987]. Строение железо-связывающих сайтов было определено с помощью рентгеноструктурного анализа [Anderson *et al.*, 1984]: ионы железа лигандируются четырьмя а.о. (D61, Y93, Y191, H252 в *N*-доле и D407, Y447, Y540, H609 в *C*-доле) и гидрокарбонатным ионом, который строго необходим для прочного связывания металла. Прочность связывания окисного железа с ЛФ значительно больше, чем закисного, так константа связывания Fe^{3+} оценивается как $10^{20} M^{-1}$, а в случае Fe^{2+} – лишь $10^3 M^{-1}$. Таким образом, не окисленное железо пренебрежимо мало связывается с ЛФ [Baker *et al.*, 1987]. Это обстоятельство подчеркивает физиологическую значимость процесса окисления $Fe(II)$ до $Fe(III)$, которое *in vivo* катализируется ферментами купредоксинового семейства, ЦП и гефестином. Функциональные дефекты генов ЦП либо гефестина приводят к нарушению метаболизма железа, в частности к отложениям $Fe(II)$ в тканях и анемии, соответственно [Harris *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003]. В норме в присутствии ферроксидазы (ЦП) за сутки в трансферрин сыворотки встраивается до 60 мг железа, а в отсутствие активности ЦП – лишь 3-5 мг, в то же время суточная потребность человека в железе составляет около 35-40 мг [Frieden and Hsieh, 1976]. При исследовании ЦП грудного молока в нашей лаборатории был обнаружен его комплекс с ЛФ [Zakharova *et al.*, 2000; Соколов и соавт., 2006]. Прочный белок-белковый комплекс ЛФ с ЦП ($K_d \sim 13$ нМ) способствует увеличению ферроксидазной активности ЦП и ускорению встраивания железа в апо-форму ЛФ [Соколов и соавт., 2005; Sokolov *et al.*, 2009]. За счет меньшего заряда на *N*-конце ЛФ мыши не взаимодействует с анионными молекулами, в том числе с ЦП [Соколов и соавт., 2006]. Показано, что ЛФ препятствует липополисахарид-индуцированной деградации экспортёра железа, ферропортина, в макрофагах и эпителиальных клетках [Cutone *et al.*, 2014; Frioni *et al.*, 2014].

Концентрация ЛФ в плазме крови в здоровом организме пренебрежимо мала по сравнению с концентрацией трансферрина, поэтому не представляется возможным рассматривать ЛФ в качестве белка, играющего существенную роль в транспорте железа в кровотоке. Однако в случае острой фазы воспаления увеличение концентрации ЛФ рассматривается как фактор,

способствующей так называемой гипоферремии воспаления, что связано с большей аффинностью ЛФ к ионам железа и активному поглощению насыщенного железом ЛФ макрофагами [Van Snik et al., 1974]. Для кроликов описана корреляция между концентрацией ЛФ в желчи и так называемым железным статусом организма: значимое увеличение ЛФ в желчи отмечалось у кроликов с анемией, вызванной острой кровопотерей, что может отражать мобилизацию железа из печени, являющейся депо этого микроэлемента. Напротив, кролики, получавшие даже небольшие дозы железа, демонстрировали ингибирование секреции ЛФ в желчь. Таким образом, ЛФ может отражать степень мобилизации железа из депо [Van Vugt et al., 1975]. Сходная корреляция между уровнем ЛФ в секрете поджелудочной железы и метаболизмом железа была показана для человека [De Vet et al., 1974].

Учитывая, что ЛФ является одним из превалирующих белков молозива и грудного молока, а также связывает значительную часть железа, ряд исследований подтвердил участие ЛФ во всасывании железа при молочном вскармливании младенцев, однако, эффект ЛФ во многом зависит от потребностей в железе. Специфический рецептор ЛФ на мембране энтероцитов (SI-LFR) способствует поглощению ЛФ, после чего около 90% белка деградирует в клетке с высвобождением железа, а 10% транспортируется через клеточную мембрану. Снижение внутриклеточной концентрации железа способствует увеличению экспрессии SI-LFR, а следовательно, и увеличению поглощения энтероцитами железа, связанного с ЛФ [Suzuki et al., 2005]. Сравнение младенцев, получавших искусственные молочные смеси и грудное молоко, показывает, что грудное вскармливание способствует лучшему усвоению железа [Fairweather-Tait et al., 1987]. Следует, однако, отметить, что ЛФ выступает не просто как неограниченный источник всасывания железа, а как регулятор этого процесса. В подтверждение этому можно привести данные о том, что добавление избыточного количества ЛФ в молоко приводит к супрессии поглощения железа, а освобожденное от ЛФ молоко, напротив, вызывает избыточное всасывание железа [Davidsson et al., 1994]. Большой интерес вызывает перспективность использования ЛФ для терапии железодефицитной анемии у беременных. Так, пероральное использование ЛФ коровы, в отличие от стандартной терапии сульфатом железа, достоверно увеличивало содержание гемоглобина и концентрацию железа в сыворотке, снижало концентрацию провоспалительного цитокина IL-6 и способствовало вынашиванию плода [Paesano et al., 2010; Paesano et al., 2014]. Важной особенностью ЛФ является способность проходить через гематоэнцефалический барьер [Fillebeen et al. 1999; Kametani et al. 2008]. Исследования на взрослых добровольцах показали, что более половины ЛФ коровы (в апо- и холо-форме) не подвергается перевариванию в желудочно-кишечном тракте [Troost et al., 2001].

Кроме того, известно, что ЛФ, прошедший кишечный тракт младенца, не лишается способности связывать ионы железа [Spik et al., 1982].

Способность ЛФ связывать железо из среды влияет на рост бактерий и ответственна за бактериостатический эффект белка [Arnold et al., 1980]. Потеря железа ингибирует рост железо-зависимых бактерий, например, *E. coli* [Brock, 1980]. Однако, ЛФ может выступать и как донор железа, способствуя росту микробиоты, например, *Lactobacillus sp.* или *Bifidobacterium sp.* [Petschow et al., 1999; Sherman et al., 2004]. Некоторые бактерии адаптируются к железо-дефицитной среде с помощью специальных сидерофоров, конкурирующих за Fe^{3+} с ЛФ [Crosa, 1989; Ratledga and Dovev, 2000]. Еще одним механизмом избегания бактериостатического эффекта ЛФ является синтез бактериями, в том числе рода *Neisseriaceae* (возбудители менингита, гонореи), специфических рецепторов, связывающих ЛФ, изменяющих его третичную структуру так, что это способствует диссоциации железа [Schryvers et al., 1998; Erkins et al., 2004]. В экспериментах *in vitro* показано, что ЛФ препятствует формированию биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. В частности, железодефицитная среда лишает бактерии подвижности и способности к адгезии на поверхности [Singh et al., 2002]. Конкуренция за железо между ЛФ и паразитом *Pneumocystis carinii* является молекулярной основой антипаразитарной активности белка [Cirioni et al., 2000]. Однако некоторые паразиты, например, *Trichostrongylus axei* и *Entamoeba histolytica*, используют ЛФ как донор железа для эффективного роста [Tachezy et al., 1996; Ortíz-Estrada et al., 2015].

Хотя в литературе имеются сведения о прямом связывании ЛФ с ДНК и обнаружении ЛФ - связывающих сайтов [He and Furmanski, 1995], следует отметить, что в настоящее время прямая активация экспрессии после связывания ДНК с ЛФ показана для сравнительно небольшого количества генов, например, для IL-1 β [Son et al. 2002] и TGF- β 1 [Jiang 2011].

1.8. Заключение по обзору литературы: сравнение лактоферрина и дефероксамина

Анализ многочисленных данных литературы, касающихся молекулярных свойств, доклинических и клинических исследований применения естественного хелатора железа – ЛФ и синтетического сидерофора, миметика гипоксии – DFO, показал, что они обладают рядом сходных свойств (Таблица 1.4).

ЛФ и DFO применяют при терапии анемии [Lee 2008; Paesano et al., 2010; Paesano et al., 2014]. Связывая пул свободного железа в клетках, ЛФ и DFO блокируют реакции Фентоновской химии, проявляя антиоксидантные свойства [Peden et al., 1991; Dendorfer et al.,

2005]. Так, для ЛФ и DFO показан защитный эффект от повреждающего действия пероксида водорода на интерстициальные эпителиальные клетки [Shoji et al., 2007]. Для обоих агентов показана стимуляция роста костной ткани [Cornish et al., 2004; Wan et al., 2008], а также эффективность при терапии трофических язв, например, диабетической стопы [Lyons et al., 2007; Engelmayer et al., 2008; Thangarajah et al., 2010].

Таблица 1.4. Общие свойства апо-формы ЛФ и DFO согласно литературным данным.

Свойство	Апо-ЛФ	DFO
Ингибирование реакций Фентоновской химии	[Peden et al. 1991; Shoji et al. 2007]	[Dendorfer et al. 2005; Shoji et al. 2007]
Противоанемический эффект	[Paesano et al. 2010, 2014]	[Lee, 2008]
Арест клеточного цикла, индукция p21 и p53	[Oh et al. 2004; Son et al. 2006]	[Mizuno et al. 2009]
Противораковая активность	[Parody 2007; Tsuda et al. 2010]	[Hoke et al. 2005; Whitnall et al. 2006]
Индукция VEGF	[Norrby 2004; Nakajima et al. 2011]	[Vaithilingam et al. 2010]
Стимуляция роста кости	[Cornish et al. 2004]	[Wan et al. 2008]
Заживление <i>pes diabeticus</i>	[Lyons et al. 2007; Engelmayer et al. 2008]	[Vaithilingam et al. 2010; Thangarajah et al. 2010]
Защитный эффект при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите	[Zimecki et al. 2007]	[Pedchenko and LeVine 1998]

Введение DFO вызывает увеличение экспрессии VEGF и выздоровление животных с экспериментальным диабетом [Vaithilingam et al., 2010]. Возможно, что защитное действие ЛФ при диабете [Lyons et al., 2007; Engelmayer et al., 2008] и его способность усиливать рост костной ткани [Cornish et al., 2004] также связаны со способностью апо-формы ЛФ активировать синтез VEGF [Norrby, 2004]. Было показано, что при обработке остеобластов ЛФ митогенный эффект белка опосредуется синтезом циклооксигеназы (COX2), транскрипционного фактора активированных Т-клеток (Nfatc1) и VEGF [Nakajima et al., 2011; Naot et al., 2011]. Эти же гены индуцируются под действием DFO, поскольку являются мишенями HIF-1 α [Seifert et al., 2009; Tafani et al., 2010]. Для ЛФ и DFO показаны

протективные свойства при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите, являющимся моделью рассеянного склероза [Pedchenko and LeVine 1998; Zimecki et al. 2007]. Известно, что DFO и ЛФ обладают противоопухолевой активностью, в том числе, вероятно, за счет способности вызывать арест клеточного цикла и индуцировать онкосупрессоры p21 и p53 [Oh et al. 2004; Hoke et al., 2005; Son et al. 2006; Whitnall et al. 2006; Parody 2007; Mizuno et al. 2009; Tsuda et al., 2010; Kovacevic et al., 2011].

Существенное отличие между ЛФ и DFO заключается в том, что если для ЛФ до сих пор не найдено токсической дозы: длительное применение ЛФ при терапии анемии у беременных женщин [Paesano et al., 2010], а также у онкологических пациентов не выявило каких-либо побочных эффектов и токсичности ЛФ [Kozu et al., 2009], то DFO не рекомендуется использовать при беременности и людям пожилого возраста из-за риска развития нарушений слуха и зрения [Cario et al., 2007].

Многочисленные совпадения свойств ЛФ и DFO явились предпосылкой исследования антигипоксической и антианемической активности ЛФ, а также молекулярной основы защитного действия ЛФ в связи с активностью HIF-сигнальной системы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы, использованные в работе

В работе использовались следующие реактивы: моноклональные антитела мыши против HIF-2 α (клон ep190b) («Abcam», США); конъюгат пероксидазы хрена с антителами ослика к IgG кролика, Bio-Gel A-1,5m, Chelex 100, Tween 20, UNO-sphere S и Q, сухое молоко, окрашенные маркеры молекулярной массы («BioRad», США); H₂O₂ (8M), бром (Br₂), дихлорэтан, триэтиламин, соль Мора (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O), цианид калия, ЭДТА («Merck», Германия); Сефароза 4В, Сефароза 6В, CM-Сефадекс С-50 («Pharmacia», Швеция); полный и неполный адъюванты Фрейнда, азид натрия, ацетонитрил, глицерол, Кумасси R-250, маннитол, 2-меркаптоэтанол, нитроцеллюлоза (NC-2), персульфат аммония, сахароза, Tris («Serva», Германия); антитела кроликов против IgG мыши, моноклональные антитела мыши против HIF-1 α (клон H1alpha67), β -аланин, глицин, *орто*-дианизидин (*o*-DA), додецилсульфат натрия (SDS), конго красный, метиловый зеленый, *пара*-фенилендиамина дигидрохлорид (*p*-PD), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 3-(2-пиридил)-5,6-бис(4-фенилсульфоновая кислота)-1,2,4-триазин (феррозин), 4-хлор-1-нафтол, («Sigma», США); AgCl, AgNO₃, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид (МБА), N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) («Лаборатория МЕДИГЕН», Россия); антитела кроликов против эритропоэтина («Протеиновый контур», Россия), ацетон, мочеви́на, хлороформ, HCl, HNO₃, KOH, NaOH, NaCl, NaHCO₃ («РЕАХИМ», Россия); гепарин («СПОФА», Польша). Измерение значений pH буферных растворов производили на портативном pH-метре «Аквилон pH-410», точность измерения 0,01 pH. Для приготовления растворов использовали апиrogenную деионизированную воду с удельным сопротивлением 18,2 МОм \times см (Медиана-Фильтр, Россия).

2.2. Хроматографические методы

Все хроматографические процедуры проводили при 4 °C в термостатируемом хроматографическом шкафу, в остальных случаях условия указаны дополнительно. Регистрацию A₂₈₀ производили в проточном спектрофотометре, фракции собирали с помощью программируемого коллектора («LKB», Великобритания). Хроматографию при комнатной температуре осуществляли на хроматографе BioLogic DuoFlow («Bio-Rad», США).

2.2.1. Синтез сорбентов

2.2.1.1. Получение бромциана

Все работы с цианидами и бромом проводились в мощном вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты. Непосредственно перед работой употребляли

раствор, содержащий, по крайней мере, 100 г сахарозы. Бромциан получали бромированием цианида калия: $\text{KCN} + \text{Br}_2 \rightarrow \text{BrCN} + \text{KBr}$. Наиболее безопасным является синтез в двухфазной системе: в плоскодонную колбу помещали 2,6 мл Br_2 в 5 мл дихлорэтана, приливали 20 мл водного раствора 2,8 М KCN при охлаждении льдом и встряхивали колбу около 10 секунд до обесцвечивания эмульсии. После разделения фаз слой дихлорэтана отбирали, к водной фазе добавляли 10 мл дихлорэтана и производили повторную экстракцию BrCN, органические фазы объединяли и определяли в них содержание BrCN аргентометрическим титрованием. К 20 мл 5%-ного раствора маннитола ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$) в 50%-ном этаноле на 10 мМ NaOH прибавляли аликвоту раствора BrCN, тщательно перемешивали и через 10 минут титровали 0,1 М HNO_3 до pH 6,0. Затем раствор титровали 0,1 М AgNO_3 по конго красному, тщательно перемешивая раствор с выпадающим AgBr, до перехода красной окраски в синюю, свидетельствующую о взаимодействии избытка ионов Ag^+ с индикатором. По количеству AgNO_3 , затраченного на титрование, рассчитывали количество Br^- -ионов и, соответственно, BrCN. Раствор BrCN в дихлорэтаноле (120 мг/мл) хранили при -20°C запаянным в стеклянные ампулы по 1 мл.

2.2.1.2. Иммунизация соединений, содержащих NH_2 -группу, на BrCN-активированной Сефарозе и агарозе

Посредством BrCN-активации можно иммобилизовать на Сефарозе 4В или агарозе (Bio-Gel A-1,5m fine) молекулы, содержащие NH_2 -группу [Cuatrecasas *et al.*, 1968]. Этот метод применялся для получения аффинных сорбентов, необходимых для выделения белков и иммуноглобулинов. Для активации 5 мл смолы отмывали на воронке с фильтром из пористого стекла 10 мл 30%-ного ацетона и 10 мл 60%-ного ацетона, охлажденными до -20°C . Затем к смоле добавляли 5 мл 60%-ного ацетона, 1 мл раствора $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ в ацетоне (150 мг/мл) и 1 мл раствора BrCN в дихлорэтаноле (100 мг/мл). После 5 мин активации при -20°C смолу последовательно отмывали на стеклянном фильтре охлажденными до -20°C 10 мл 60%-ного ацетона, 10 мл 30%-ного ацетона и 50 мл дистиллированной воды, подкисленной HCl до pH 3,0 при 0°C . Для сшивки со смолой к ней добавляли равный объем PBS, содержащий лиганд (10 мг на 1 мл смолы). Реакцию проводили в течение 12 часов при перемешивании на шуттеле при 4°C . Сорбенты с иммобилизованным неомицином после синтеза обрабатывали 1 М NaCl и 0,2 М Tris-глицином pH 8,0. Полученные смолы хранили в PBS с добавлением NaN_3 до концентрации 0,02 %.

2.3. Спектрофотометрия

Спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой области измеряли с помощью спектрофотометра СФ-2000-02 («ОКБ-Спектр», Санкт-Петербург). Используемые в работе коэффициенты молярной экстинкции приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Коэффициенты молярной экстинкции веществ

Вещество (специальные условия)	λ , нм	ϵ , $M^{-1} \times cm^{-1}$	Источник
ЦП	610	10000	[Noyer <i>et al.</i> , 1980]
ЛФ (апо-форма)	280	85700	[Gifford <i>et al.</i> , 2012]
ЛФ (насыщенный Fe^{3+})	465	4267	[Zakharova <i>et al.</i> , 2000]
ЛФ (насыщенный Cu^{2+})	435	4805	[Zakharova <i>et al.</i> , 2000]
Трансферрин (апо-форма)	280	89155	[Соколов и соавт., 2005]
Трансферрин (насыщенный Fe^{3+})	465	4446	[Соколов и соавт., 2005]
Fe^{2+} -феррозин	564	27900	[Пулина и соавт., 2010]

2.4. Аналитические методы

2.4.1. Пара-фенилендиамин-оксидазная активность церулоплазмينا

Пара-фенилендиамин (*p*-PD) окисляется ЦП с образованием окрашенного в фиолетовый цвет продукта конденсации [Ravin, 1961]. Реакционная смесь включала 1,58 мл 0,5 М Na-ацетатного буфера, pH 5,5, 0,2 мл свежеприготовленного раствора дигидрохлорида *p*-PD (0,5 %) и 0,02 мл пробы, содержащей ЦП. Реакцию проводили при 37 °С на водяной бане в течение 1 часа. Останавливали реакцию, добавляя к пробе 0,2 мл 0,5%-ного NaN_3 . Контрольной пробой служила реакционная смесь с 0,2 мл 0,5%-ного NaN_3 , добавленного до инкубации. Метод применим как для определения *p*-PD-оксидазной активности ЦП, так и для определения концентрации ЦП. Оптическая плотность раствора при 530 нм (A_{530}), измеренная против контрольной пробы, при умножении на коэффициенты 0,875 либо 0,69 показывала концентрацию ЦП человека либо крыс соответственно в тестируемом образце в мг/мл.

2.4.2. Ферроксидазная активность церулоплазмينا

Ферроксидазную активность ЦП определяли по убыли Fe^{2+} . Для этого 10 мкл сыворотки добавляли к 0,9 мл 0,25 мМ раствора $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$ в 0,45 М натрий-ацетатном буфере, pH 5,8, и инкубировали 8 минут при 37 °С. Затем в пробу добавляли 50 мкл 18 мМ феррозина и

40 мкл 0,5% азид натрия и измеряли A_{564} (к контрольной пробе азид натрия добавляли до начала инкубации). Активность выражали в мМ окисляемого железа за час для неразбавленной сыворотки.

2.4.3. Измерение концентрации гемоглобина

Для определения концентрации гемоглобина 10 мкл цельной крови (не допуская коагуляции) добавляли к 1 мл 0,04 %-ного водного раствора аммиака и измеряли A_{575} (контролем служил раствор аммиака). Уровень гемоглобина выражали в относительных единицах, принимая значение в первый день эксперимента за 100 %.

2.4.4. Измерение концентрации железа в сыворотке крови

Концентрацию железа в сыворотке измеряли после восстановления аскорбиновой кислотой и образования цветного комплекса с феррозином. К 0,2 мл сыворотки добавляли 1 мл 0.1 М аскорбиновой кислоты (рН 5,0) и 0,02 мл 18 мМ феррозина. Изменяли A_{564} против контрольной пробы без добавления феррозина и, умножая значение на коэффициент 442 (определенный по калибровочному графику), получали значение концентрации железа в мкМ.

2.5. Электрофоретические методы

2.5.1. Диск-электрофорез в щелочной системе

ЭФ нативных белков с $pI < 7$ проводили в 7,5%-ном разделяющем ПААГ, содержащем 375 мМ Tris-HCl буфер, рН 8,9 [Davis, 1964]. В качестве концентрирующего геля использовали 5%-ный ПААГ, содержащий 125 мМ Tris-HCl буфер, рН 6,8. Для полимеризации в смесь буфера и акриламида (акриламид/метиленабисакриламид = 30/0,8, w/w) добавляли ТЕМЕД до 0,1 % и 25%-ный персульфат аммония до конечной концентрации 0,1 %. В качестве электродного буфера использовали 4,94 мМ Tris, 38,4 мМ глициновый буфер, рН 8,3. Исследуемый образец (1–50 мкг белка) наносили в соотношении 4:1 (v/v) с 62,5 мМ Tris-HCl-буфером, рН 6,8, содержащим 0,001 % бромфенолового синего и 50 % глицерола. ЭФ проводили в течение 2,5–3 часов при температуре +4 °С при градиенте потенциала 15–20 В/см (2–5 мА на 1 см геля) в аппарате для вертикального ЭФ. В качестве маркера, позволяющего определить время завершения ЭФ, использовали краситель бромфеноловый синий. После ЭФ гели окрашивали 0,5%-ным Кумасси бриллиантовым синим R-250 в 25%-ном этаноле и 10%-ной CH_3COOH в течение 30 мин. Для отмывки использовали тот же раствор без добавления Кумасси R-250.

*2.5.1.1. Выявление *o*-дианизидин-оксидазной активности после электрофореза*

Специфическую оксидазную активность ЦП выявляли путем окрашивания гелей раствором *o*-DA [Owen and Smith, 1961]. Для этого гели после ЭФ помещали на 10 минут в 0,4 М Na-ацетатный буферный раствор, pH 4,7, для приведения геля к условиям, необходимым для окраски (ЭФ проводился при pH 8,3), а затем добавляли 1%-ный раствор дигидрохлорида *o*-DA в 1%-ном Тритоне X-100 до конечной концентрации 0,05 % и инкубировали при 37°C в течение 1–2 часов (до развития окраски).

2.5.2. Диск-электрофорез в кислой системе

ЭФ нативных белков (pI>7) проводили в 7,5%-ном разделяющем ПААГ, содержащем 374 мМ CH₃COOH-KOH буфер, pH 4,3 [Маурер, 1971]. В качестве концентрирующего геля использовали 5%-ный ПААГ, содержащий 125 мМ CH₃COOH-KOH буфер, pH 6,7. Для полимеризации в раствор добавляли тиомочевину до 0,1 % и 30%-ный пероксид водорода до 0,03 %. В качестве электродного буфера использовали 35 мМ β-аланин, 14 мМ ацетатный буфер, pH 4,5. Исследуемый образец (1–50 мкг белка) наносили в соотношении 4:1 (v/v) с 62,5 мМ CH₃COOH-KOH, pH 6,7, содержащим 0,001 % метилового зеленого и 50% глицерола. ЭФ проводили в течение 2,5–3 часов при температуре +4 °С при градиенте потенциала 15–20 В/см (2–5 мА на 1 см геля) в аппарате для вертикального ЭФ.

2.5.3. Электрофорез в щелочной системе в присутствии SDS

Молекулярную массу, а также чистоту белка определяли с помощью ЭФ в присутствии SDS в ПААГ, содержащем 375 мМ Tris-HCl буфер, pH 8,9 [Laemmli, 1970]. В качестве концентрирующего геля использовали 5%-ный ПААГ, содержащий 125 мМ Tris-HCl буфер, pH 6,8. В гель добавляли глицерол до 0,5 % и SDS до 0,1 %. Для полимеризации в смесь буфера и акриламида (акриламид/метиленабисакриламид = 30/0,8, w/w) добавляли TEMED до 0,1 % и 25%-ный персульфат аммония до конечной концентрации 0,1 %. Исследуемый образец (1–100 мкг белка) смешивали в соотношении 4:1 (v/v) с 125 мМ 1М Tris-HCl, pH 6,8, содержащим 2 % SDS, 0,1 % 2-меркаптоэтанола, 0,001 % бромфенолового синего и 50 % глицерола. Перед нанесением пробу нагревали на водяной бане в течение 1 минуты. ЭФ проводили в течение 2,5–3 часов при температуре +4 °С и при градиенте потенциала 15–20 В/см. В качестве электродного буфера использовали 16,5 мМ Tris, 128 мМ глициновый буфер, pH 8,3, содержащий 0,1 % SDS. Перед окрашиванием гель отмывали от SDS в растворе 50%-ного этанола и 10%-ной CH₃COOH в течение ночи. Окраска Кумасси R-250 и отмывка те же, что и для ЭФ без детергентов.

2.5.4. Электрофорез в присутствии SDS в высокомолярной Tris-буферной системе

Для разделения белков с улучшенным разрешением использовали электрофорез в ПААГ с 750 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,9 [Fling and Gregerson, 1986]. В качестве концентрирующего геля использовали 5%-ный ПААГ, содержащий 125 мМ Tris-HCl буфер, pH 6,8. В гель добавляли сахарозу до 10 % и SDS до 0,1 %. Для полимеризации в смесь буфера и акриламида (акриламид/метиленабисакриламид = 30/0,8, w/w) добавляли ТЕМЕД до 0,1 % и 25 %-ный персульфат аммония до конечной концентрации 0,1 %. Приготовление образца, проведение ЭФ и окрашивание геля проводили аналогично разделу 2.5.3.

2.6. Получение белковых препаратов

2.6.1. Выделение церулоплазмينا сыворотки крови крыс и мышей

К 100 мл сыворотки крови добавляли 2 мМ 6-аминокапроновой кислоты и 0,1 мМ PMSF и наносили ее со скоростью 10 мл/мин на колонку с UNO-Sphere Q (5×2,5 см), предварительно уравновешенную PBS [Соколов и соавт., 2012]. Колонку последовательно отмывали от балластных белков PBS и 40 мМ TEA-HCl (pH 7,4) до $A_{280} < 0,005$ в оттекающем с колонки растворе. Отмытую колонку оставляли на ночь в холодной комнате. На следующий день колонку соединяли с хроматографом BioLogic DuoFlow и использовали при хроматографии растворы, охлажденные на льду. Элюцию белков проводили со скоростью 2 мл/мин линейным градиентом по 200 мл 0→0,5 М NaCl, содержащих 40 мМ TEA-HCl (pH 7,4). Окрашенные в синий цвет фракции объединяли, разбавляли в 10 раз 20 мМ TEA-HCl (pH 7,4) и наносили со скоростью 5 мл/мин на колонку с неомицин-агарозой (12×2,5 см), уравновешенную 40 мМ TEA-HCl (pH 7,4). Колонку промывали 40 мМ TEA-HCl (pH 7,4) до $A_{280} < 0,005$ в оттекающем с колонки растворе. Элюцию белков проводили со скоростью 2 мл/мин с помощью линейного градиента по 120 мл 0→400 мМ NaCl, содержащих 40 мМ TEA-HCl (pH 7,4). Окрашенные в синий цвет фракции объединяли, концентрировали на ячейке VivaSpin 20, дважды разбавляя сконцентрированный до 2 мл белок 18 мл 40 мМ TEA-HCl (pH 7,4).

2.6.2. Выделение лактоферрина грудного молока

Двухэтапный метод получения ЛФ из грудного молока был разработан в нашей лаборатории [Zakharova *et al.*, 2000]. Грудное молоко (2000 мл) делипидировали центрифугированием в течение часа при 500 *g* и 30 минут при 10000 *g*, фильтровали на воронке Бюхнера под давлением вакуумного насоса через 6 слоев марли и 2 слоя фильтровальной бумаги. Фильтрат центрифугировали при 10000 *g* в течение 30 минут и еще раз фильтровали на складчатом фильтре. Обезжиренное молоко наносили на колонку (5×12 см) с CM-Сефадексом, затем отмывали несвязавшиеся белки 500 мл PBS. ЛФ, задержавшийся на колонке, элюировали

градиентом NaCl: по 300 мл 0,15 М – 1 М NaCl, содержащих 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4. На следующем этапе ЛФ подвергали гель-фильтрации на колонке с Сефакрилом S-200 HR (1×112 см).

2.6.3. Выделение трансферрина из сыворотки крови человека

Трансферрин (ТФ) из сыворотки крови выделяли после ее разбавления в 5 раз 10 мМ натрий-цитратным буфером (pH 7,0) и добавления 200 мкМ FeCl₃. Подготовленную сыворотку наносили на колонку с DEAE-Toyopearl (15×5 см), уравновешенную 10 мМ натрий-цитратным буфером (pH 7,0), затем промывали таким же буфером до $A_{280} < 0,005$ в оттекающем с колонки растворе. ТФ элюировали градиентом 100 мл 0→150 мМ NaCl, содержащих 10 мМ натрий-цитратного буфера (pH 7,0). Окашенные в красный цвет фракции (с максимальным поглощением при 465 нм) наносили на колонку с UNO-Sphere S (5×2,5 см) уравновешенную 10 мМ натрий-ацетатным буфером (pH 5,0), затем промывали таким же буфером до $A_{280} < 0,005$ в оттекающем с колонки растворе. ТФ элюировали градиентом 100 мл 0→0,5 М NaCl, содержащих 10 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 5,0). Ко всем фракциям добавляли 50 мМ натрий-цитратного буфера (pH 7,0) и 200 мкМ FeCl₃ и окрашенные в красный цвет фракции концентрировали на ячейке VivaSpin 20 и подвергали гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-75 Superfine (2,5×150 см). Окрашенные в красный цвет фракции объединяли, диализовали против 50 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 4,5), а затем бесцветный белок диализовали против PBS.

2.6.4. Подготовка образцов тканей для выявления иммунореактивных белков

Предварительно замороженные при -70 °С образцы тканей (либо изъятые непосредственно после декапитации и вскрытия животного) помещали на лёд и гомогенизировали между стеклом и тефлоном с трехкратным объемом (w/v) буфера, содержащего коктейль ингибиторов протеиназ («Roche»), 250 мМ сахарозы, 25 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl, (pH 7,4). Гомогенат центрифугировали 15 минут при 15000g (4°C) и определяли в надосадочной жидкости концентрацию белка с помощью микро-варианта метода Брэдфорд [Bradford, 1976]. Надосадочную жидкость разводили буфером для гомогенизации и смешивали с буфером для образцов для SDS-ЭФ в ПААГ (см. раздел 2.5.3) так, чтобы наносить 100 мкг общего белка на дорожку в объеме приблизительно 20-25 мкл.

2.7. Иммунохимические методы

2.7.1. Подготовка антигенов для иммунизации

Для увеличения иммунного ответа антигены перед иммунизацией подвергали электрофорезу в ПААГ (ЦП крыс либо ЦП мыши подвергали электрофорезу согласно разделу 2.5.1, ЛФ человека подвергали электрофорезу согласно разделу 2.5.2), после электрофореза края геля отрезали и окрашивали Кумасси R-250. Неокрашенную полоску ПААГ с основным количеством белка разделяли на части, содержащие около 100 мкг белка. Части ПААГ замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранили до иммунизации.

2.7.2. Иммунизация кроликов

Для иммунизации кроликов фрагменты ПААГ с белком (при расчете 100 мкг на кролика) измельчали в гомогенизаторе с PBS и полным (неполным для 2 и 3 иммунизации) адьювантом Фрейнда (1/10 от объема смеси). Суспензии вводили внутривенно в паравertebralную область с интервалами в две недели, и через 10–12 суток после третьей иммунизации из ушной вены у кроликов забирали кровь (по 50 мл). После свертывания крови полученную сыворотку замораживали и использовали как антисыворотку для иммуноэлектрофореза. Часть сыворотки использовали для выделения аффинных IgG.

2.7.3. Выделение иммуноглобулинов G сыворотки

После свертывания крови полученную сыворотку использовали для выделения IgG. Белки высаливали путем насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 1,75 М. Осадок, содержащий IgG, промывали три раза 1,75 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, растворяли в PBS и диализовали против 0,0175 М Na-фосфатного буфера, pH 6,3. Полученный раствор пропускали через колонку с DEAE-Сефадексом А-50. Антитела выходили с колонки в свободном объеме буфера. Вторую фракцию IgG элюировали 0,035 М Na-фосфатным буфером, pH 7,6. Эти фракции, которые, согласно ЭФ в ПААГ с SDS, содержали единственный белок с M 160 кДа (при разрыве S-S связей – 60 и 20 кДа-зоны), были объединены. IgG диализовали против дистиллированной воды до исчезновения осадка при анализе пробы с солями Ba^{2+} на присутствие фосфатов и затем лиофилизировали.

Для выделения аффинных антител на колонку с белком, иммобилизованным на BrCN-активированной Сефарозе, предварительно уравновешенную PBS, наносили 150 мл сыворотки, промывали PBS с 1М NaCl и затем элюировали аффинные IgG 0,2 М Gly-HCl, pH 2,4. Фракции собирали в пробирки, содержащие 0,5 объема 0,4 М Tris-HCl, pH 8,0. Фракции, которые, согласно ЭФ в ПААГ с SDS, содержали единственный белок с M 160 кДа (при разрыве S-S

связей – 60 и 20 кДа-зоны), были объединены и после диализа против 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, заморожены при –70 °С.

2.7.4. Вестерн-блоттинг

Для выявления специфических зон в ПААГ после ЭФ применяли метод электрофоретического переноса на нитроцеллюлозный фильтр и детекцию специфических зон с помощью иммуноферментного анализа – Вестерн-блоттинг [Anderson *et al.*, 1982]. Для переноса использовали аппарат, состоящий из двух плоских электродов. Все действия с нитроцеллюлозным фильтром проводили в перчатках, посуду для смачивания фильтра в буферах и для дальнейшей детекции антигенов тщательно отмывали от жировых и белковых загрязнений. На горизонтальную поверхность анода последовательно помещали систему из нитроцеллюлозного фильтра, ПААГ и бумажных фильтров, смоченных специальными буферами для переноса, мягко прокатывая по поверхности бумажных фильтров толстой стеклянной трубкой для удаления пузырьков воздуха между ними, по следующей схеме:

Анод (низ)	Буфер I	1 М Tris-HCl, рН 10,4	34 мл
6 фильтров в буфере I	Этанол		20 мл
3 фильтра в буфере II	H ₂ O		До 100 мл
нитроцеллюлозный фильтр в буфере II	Буфер II	1 М Tris-HCl, рН 10,4	2,5 мл
ПААГ	Этанол		20 мл
3 фильтра в буфере III	H ₂ O		До 100 мл
Целлофан	Буфер III	1 М Tris-HCl, рН 9,4	2,5 мл
9 фильтров в буфере III	Этанол		20 мл
Катод (верх)	H ₂ O		До 100 мл

Перенос белков на нитроцеллюлозный фильтр проводили при 90–100 мА в течение 1 часа. После переноса фильтр обрабатывали по следующей схеме:

- 1) отмывка в H₂O (10 минут);
- 2) инкубация в ВЛОТТО-Т (30 минут при 37 °С или 15 часов при 4 °С);

3) инкубация с антителами мыши либо кролика против исследуемого белка (15 часов при 4 °С), разведение антител определяется эмпирически, обычно, начиная с 1:1000; в случае использования антител, полученных от кроликов, сокращали последующие стадии 5 и 6.

4) промывание BLOTTO-T (3×5 минут);

5) инкубация с антителами кроликов против IgG мыши (1 час при 37 °С), разведение конъюгата – 1:1000;

6) промывание BLOTTO-T (3×5 минут);

7) инкубация с конъюгатом «антитела осла к IgG кролика – пероксидаза хрена» (1 час при 37 °С), разведение конъюгата – 1:10000;

8) промывание PBS (3×5 минут);

9) выявление конъюгата при добавлении 12 мл раствора субстрата.

BLOTTO-T: 3%-ное обезжиренное молоко в PBS с 0,05 % Tween 20.

Субстрат: 6 мг 4-хлор-1-нафтола, 2 мл метанола, 6 мкл 30%-ного H₂O₂, до 12 мл TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) либо 2 мг о-дианзидина, 6 мкл 30%-ного H₂O₂, до 12 мл TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4).

Нитроцеллюлозный фильтр с проявившимися фиолетовыми либо оранжевыми зонами хранили в темноте.

2.7.5. Твердофазный иммуоферментный анализ эритропоэтина

В полистирольные планшеты с антителами к эритропоэтину (ЭПО, «Вектор-бест», Россия), предварительно проинкубированные 1 час при комнатной температуре, вносили 0,1 мл стандартных растворов ЭПО (2-100 мМЕ/мл) либо 0,1 мл исследуемых образцов и инкубировали на термошейкере при 270 об/мин и 37 °С в течение 1 часа. Затем в лунки на 1 час вносили по 0,1 мл раствора антител против эритропоэтина, меченых пероксидазой хрена. После каждого из растворов планшет тоекратно промывали PBS. Пероксидазную метку проявляли смесью на основе тетраметилбензидаина и H₂O₂. После остановки хромогенной реакции 0,05 мл 6 M H₂SO₄ измеряли A₄₀₅ содержимого лунок на планшетном фотометре StatFax (США). Зависимость A₄₀₅ от концентрации ЭПО аппроксимировали прямой по методу наименьших квадратов, коэффициент детерминированности (R²) составлял не менее 0,99

(Microsoft Excel 2002). С помощью полученного уравнения $A_{492} = k[\text{ЭПО}] + b$ рассчитывали содержание ЭПО в образцах.

2.7.6. Ракетный иммуноэлектрофорез церулоплазмина крыс

Ракетный иммуноэлектрофорез ЦП крыс производили [Laurell, 1967], используя буферный раствор барбитал-глицин-Tris:

Буфер 1		Буфер 2	
Барбитал – натрий	65 г	Глицин	281 г
Барбитал	10.35 г	Tris	226 г
H ₂ O	До 5 л	H ₂ O	До 5 л

Барбитал растворяли в 1 л доведенной до кипения дистиллированной воды при перемешивании. Смешиванием равных объемов буферов 1 и 2 получали буферный раствор с рН 8.8.

Иммуноэлектрофорез проводили в 1 %-ной агарозе, приготовленной на этом буфере, из расчета 0.19 мл агарозы на 1 см² стеклянной пластины (чаще всего использовали пластину размером 60×90×1 мм и брали на нее 10 мл агарозы), оптимальную концентрацию антител в геле находили экспериментально. Соответствующее количество расплавленной 1 %-ной агарозы охлаждали до 60°C, добавляли антитела, выливали на уравновешенное стекло и проводили электрофорез в течение 17 часов при напряжении 10 В/см, нанося на пробу 1-10 мкг белка. После электрофореза гель отжимали при помощи фильтровальной бумаги слоем 2-3 см, на которую помещали груз (10 г/см²) на 10 мин. Для проявления ферментативной активности ЦП в иммунопреципитатах стекло с тонкой пленкой геля 5 минут отмывали в растворе 0.4 М СН₃СООН-СН₃СООNa, рН 4.7, а затем помещали в раствор *o*-дианизидина и инкубировали при 37°C в течение 2-4 часов (до развития окраски). Для окрашивания иммунопреципитатов Кумасси бриллиантовым синим слой геля, превращенный в тонкую пленку, плотно прилегающую к стеклу, отмывали в физиологическом растворе, высушивали, а затем окрашивали подобно ПААГ после ЭФ.

2.8. Изучение антигипоксической активности

Антигипоксическую активность белковых препаратов изучали на мышах–гибридах F1CBA×C57BL, вес 20±2 г, в модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией. Предварительно мышей сортировали по устойчивости к гипоксии, отбирая мышей,

сохранявших естественную позу в герметичном сосуде объемом 200 мл в течение 18 минут (17-19 минут). После такого отбора животных оставляли на 1 месяц, вводили исследуемые препараты и вновь регистрировали время сохранения естественной позы в разные временные промежутки после введения апо-формы и насыщенной железом формы лактоферрина, трансферрина, альбумина сыворотки человека (75 мг/кг).

2.9. Изучение антианемической активности

2.9.1. Модель постгеморрагической анемии

Эксперименты проводились на самцах крыс линии «Вистар», вес 210 ± 15 г. Животных поделили на 3 группы по 6 крыс в каждой. В течение 4 дней под эфирным наркозом у животных обеих групп отбирали по 3 мл крови, еще два забора проводили на 7-й и 8-й день эксперимента. Ежедневно анализировали концентрацию гемоглобина, уровень сывороточного железа. Начиная с 7-го дня животным экспериментальной группы вводили внутривенно 75 мг/кг ЛФ человека (в апо-и насыщенной железом формах) в 1 мл физиологического раствора в течение четырех дней. Контрольной группе вводили по 1 мл физиологического раствора. С 9-го по 13-й день эксперимента у животных отбирали ежедневно по 0,2 мл крови для анализа уровня гемоглобина. На 14-й день у животных отбирали по 2 мл крови и дополнительно определяли концентрацию железа в сыворотке.

2.9.2. Модель гемолитической анемии

Крысам линии «Вистар» однократно внутривенно вводили сублетальную дозу фенилгидразина 250 мг/кг в 2 мл PBS. На следующий день животным вводили апо-форму или насыщенную железом форму ЛФ (75 мг/кг) либо PBS (контрольная группа) – по 15 животных в группе. В этот день, через 3 и 6 дней после индукции гемолитической анемии оценивали уровень гемоглобина и концентрацию железа в сыворотке крови.

2.10. Содержание крыс на диете с хлоридом серебра

Беременных самок крыс линии «Вистар» содержали в отдельных клетках и сразу после рождения потомства заменяли корм на аналогичный с добавлением хлорида серебра (2,5 г на 1 кг сухого корма). Крысы имели свободный доступ к корму, получая при этом около 50 мг AgCl ежедневно. Потомство этих крыс далее содержалось на такой же диете в течение 3-4 месяцев. Эксперимент по постгеморрагической анемии модифицировали: у 80 крыс отбирали по 4 мл цельной крови в течение 4 дней, на 5-й, 6-й и 7-й дни половине животных вводили 75 мг/кг апо-ЛФ, другой половине – PBS. На 1-й, 4-й и 14-й дни по 5 животных наркотизировали тиопенталом, проводили через аорту перфузию PBS (с добавлением гепарина), извлекали

печень и селезенку для анализа металлов. Органы гомогенизировали в 3-кратном избытке (w/w) смеси $\text{HClO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4$ (4:1). Гомогенат центрифугировали при 13000g в течение 15 минут и определяли концентрацию Ag, Cu и Fe с помощью атомно-абсорбционного спектрометра PinAAcle-900 (Perkin-Elmer, США).

2.11. Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2002. Эксперименты повторяли три раза ($n=3$, если не указано иначе) и среднее значение рассчитывали как $X_m = (1/n)\sum X_i$, где X_i – значение, полученное в каждом опыте. Расчет стандартного квадратичного отклонения измеренных значений от среднего проводили

по формуле: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$. Для проверки гипотезы, что анализируемая выборка имеет

нормальное распределение, использовали критерий Колмогорова–Смирнова для $\alpha = 0,05$. Для расчета коэффициентов **a** и **b** линейной зависимости $y = ax + b$ по экспериментальным данным использовали метод наименьших квадратов. Для оценки степени соответствия фактических и расчетных значений **y** вычисляли коэффициент детерминированности (нормированный от 0 до

1) по формуле: $R^2 = (\frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y})^2$. При R^2 близком к 1 считали, что нет различия между

фактическими и расчетными значениями **y**, т. е. имеет место полное соответствие теоретической линейной зависимости. Стандартное квадратичное отклонение для

коэффициентов **a** и **b** вычисляли по формулам: $\sigma_a^2 = \frac{\sigma^2}{n(\bar{x}^2 - (\bar{x})^2)}$ и $\sigma_b^2 = \sigma_a^2 \bar{x}^2$. При расчете

стандартного квадратичного отклонения для **c** – координаты пересечения прямой с осью

абсцисс ($c = -\frac{b}{a}$) использовали формулу: $\sigma_c^2 = c^2 (\frac{\sigma_a^2}{a^2} + \frac{\sigma_b^2}{b^2})$.

Доверительные интервалы рассчитывали как $X_m \pm (\sigma/n^{1/2})t_{n-1, 1-\alpha/2}$, значения t (t-критерий Стьюдента) были взяты из табличных значений при условии, что $\alpha = 0,05$.

В случае сравнения экспериментальных данных с расчетным значением использовали одновыборочный t-критерий, нулевую гипотезу принимали при $p > 0,05$.

В случае множественных сравнений использовали двухфакторный и трехфакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Тьюки, нулевую гипотезу принимали при $p < 0,05$.

2.12. Получение образцов от здоровых доноров и лабораторных животных

Протоколы получения образцов плазмы крови, грудного молока, а также протоколы иммунизации кроликов и крыс с целью получения антисыворотки согласованы с локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ».

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование антигипоксической активности лактоферрина на модели острой гипоксии с гиперкапнией у мышей

При сравнении антигипоксической активности препаратов ЛФ использовали апо-форму и насыщенную железом форму белка (75 мг/кг), через 1 час и 24 часа после внутрибрюшинного введения низкоустойчивым к гипоксии мышам, которые при предварительном тестировании показывали время сохранения позы в условиях острой гипоксии в пределах 17-19 минут. Результаты представлены на Рис. 3.1. Использованный в качестве отрицательного контроля альбумин сыворотки крови (ЧСА) не повлиял на время сохранения позы животными. Апо-форма ЛФ только при введении за 24 часа до тестирования увеличивала время сохранения позы низкоустойчивыми мышами на 30%, что позволяло отнести таких животных к группе высокоустойчивых к гипоксии. Насыщенный ионами железа ЛФ (Fe₂-ЛФ) не повлиял на время сохранения позы животными.

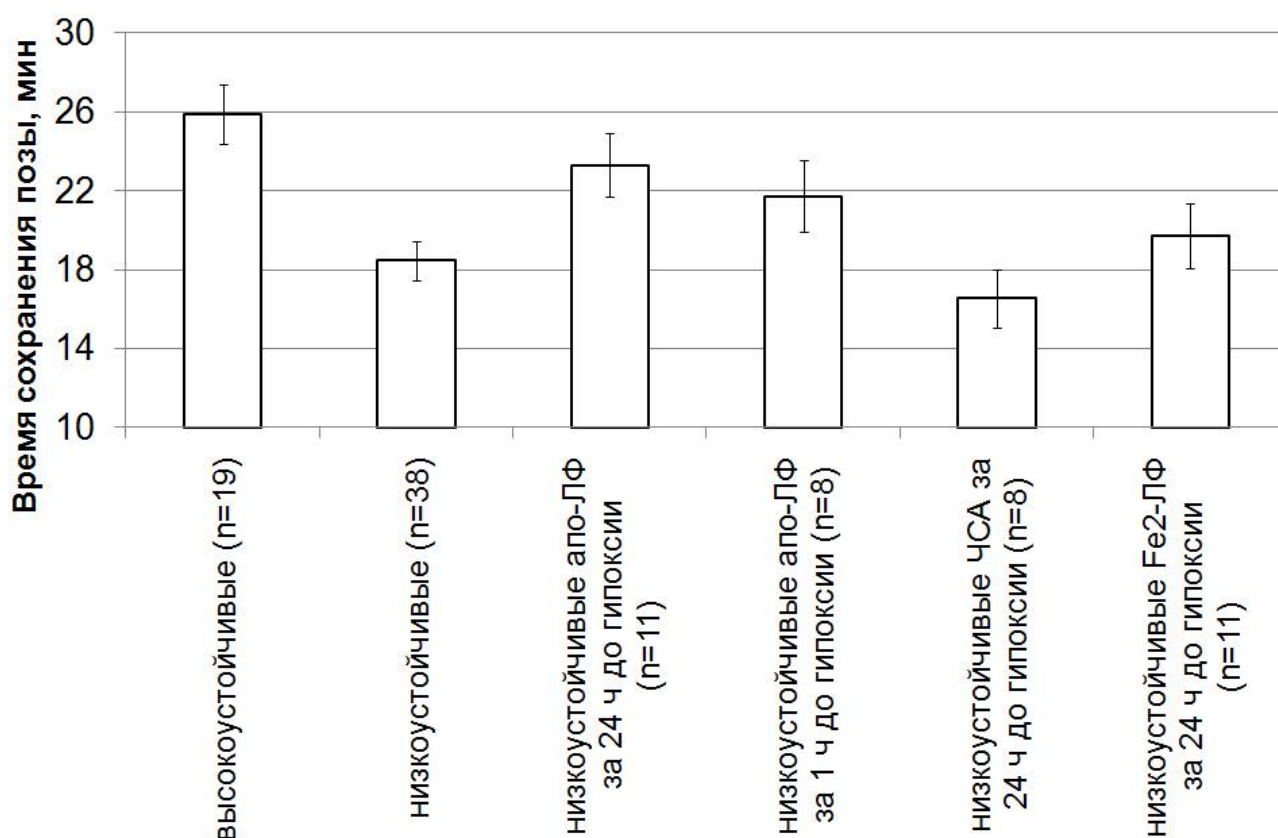


Рис. 3.1. Время сохранения позы в условиях острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией низкоустойчивых к гипоксии мышей после введения тестируемых препаратов (75 мг/кг). Для сравнения дан столбик для группы высокоустойчивых к гипоксии мышей. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

В независимых экспериментах нами было показано, что эквивалентный объем PBS и трансферрин (75 мг/кг) не влияли на время сохранения позы животными при тестировании через 1 и 24 часа после их внутрибрюшинного введения. ЛФ, выделенный из молока коров, также продемонстрировал антигипоксическую активность, но только в апо-форме и при введении за 24 часа до тестирования. В связи с отсроченным эффектом действия, нами был сделан предварительный вывод, что антигипоксическая активность апо-формы ЛФ связана с активацией адаптационных сигнальных путей организма животных.

3.2. Исследование антианемической активности лактоферрина на моделях острой постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс

Для сравнения влияния апо- и насыщенной железом форм ЛФ мы использовали модель постгеморрагической анемии у крыс (см. раздел 2.9.1). Критерием развития анемии в ходе эксперимента служило понижение уровня гемоглобина (Рис. 3.2).

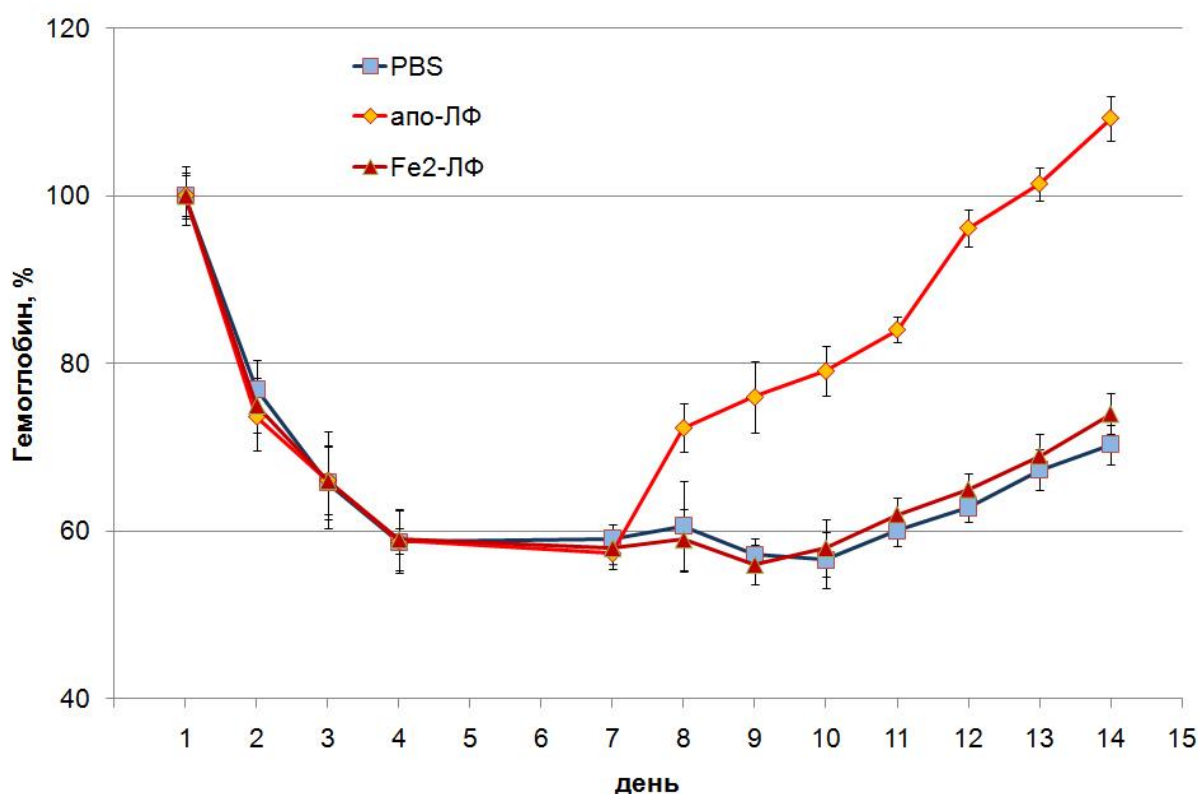


Рис. 3.2. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ (7-й-10-й дни) на концентрацию гемоглобина у крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й, 7-й и 8-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Чтобы подтвердить, что недостаток гемоглобина вызван дефицитом железа, мы определяли количество этого микроэлемента в сыворотке крови (Рис. 3.3). На 4-й день эксперимента уровень гемоглобина снизился до 59 % от первоначального. После следующей кровопотери (7-й день) уровень гемоглобина существенно не изменился и составил 58 % от исходного. К этому моменту концентрация железа в сыворотке снизилась до 20 мкМ, т.е. приблизительно втрое относительно исходного.

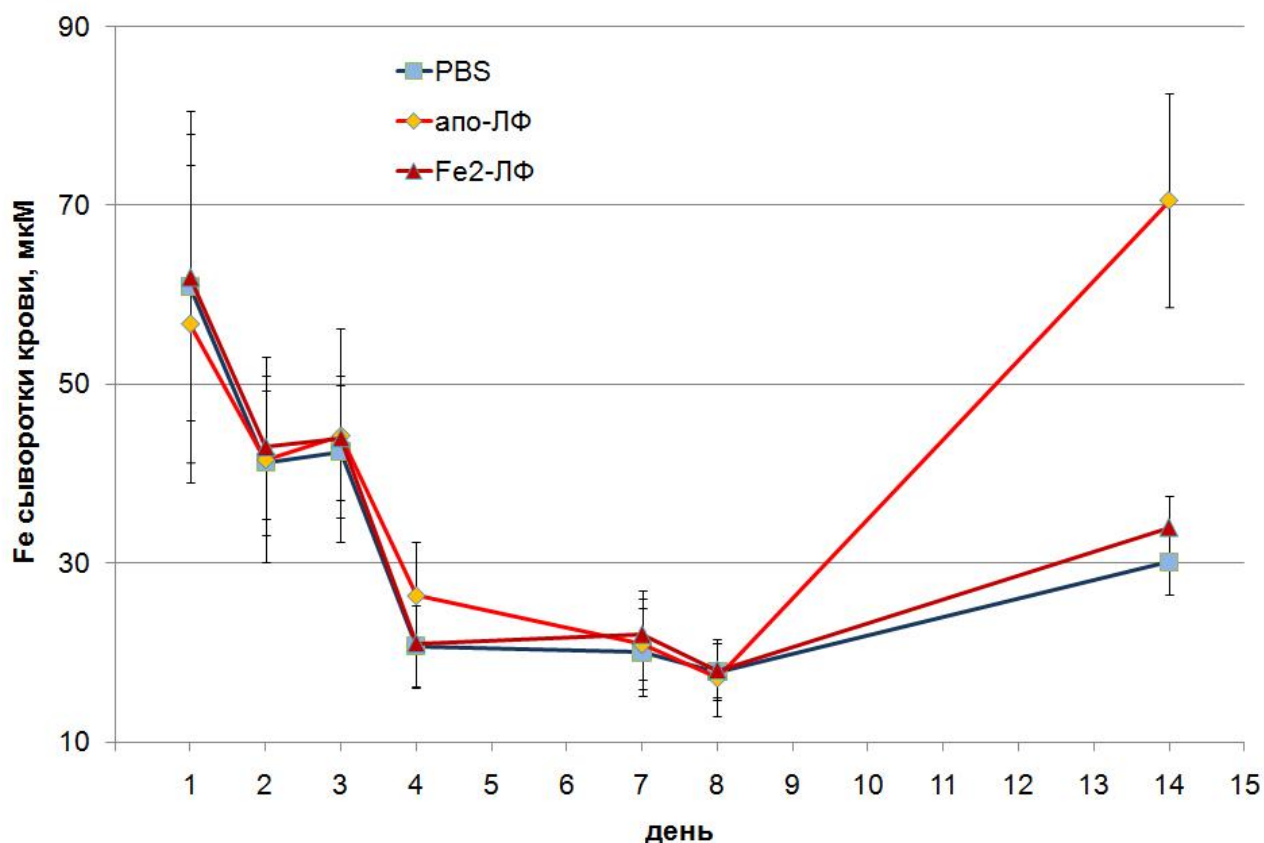


Рис. 3.3. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ (7-й–10-й дни) на концентрацию Fe сыворотки крови у крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й, 7-й и 8-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

С 7-го дня двум группам крыс начали вводить ЛФ человека (апо- и насыщенная железом форма), контрольной группе – эквивалентный объем PBS. На следующий день после первой инъекции уровень гемоглобина в группе с апо-ЛФ повысился до 72 %, а в контрольной группе и в группе с Fe₂-ЛФ – до 61 %. Далее различия усиливались: на 14-й день у животных, получавших апо-ЛФ, гемоглобин превысил исходный уровень (109 %), тогда как в контрольной группе и в группе с Fe₂-ЛФ он достиг только 70 %. С 9-го по 13-й день эксперимента уровень железа не измеряли, поскольку для проведения этого теста требовалось не менее 2 мл крови. К

14-му дню различия в группах становились разительными: у крыс, получавших апо-ЛФ, уровень сывороточного железа поднялся до 125 %, а у животных контрольной группы и группы с Fe₂-ЛФ он составил только 49 % от исходного. Таким образом, как и в опытах по изучению антигипоксической активности – апо-форма ЛФ, в отличие от насыщенной железом формы, проявила выраженную антианемическую активность.

Модель гемолитической анемии с использованием фенилгидразина была ранее описана для мышей [Hodgson, 1973]. Введение этого гемолитического агента крысам в сублетальных дозах (250 мг/кг, см. раздел 2.9.2) привело к осветлению цвета глаз и снижению уровня гемоглобина – признаки, характерные для гемолитической анемии. На следующий день после инъекции гемолитического агента у этих животных концентрация гемоглобина снижалась до 42% от первоначальной (Рис. 3.4). Исходный уровень гемоглобина восстанавливался только на 6-й день.

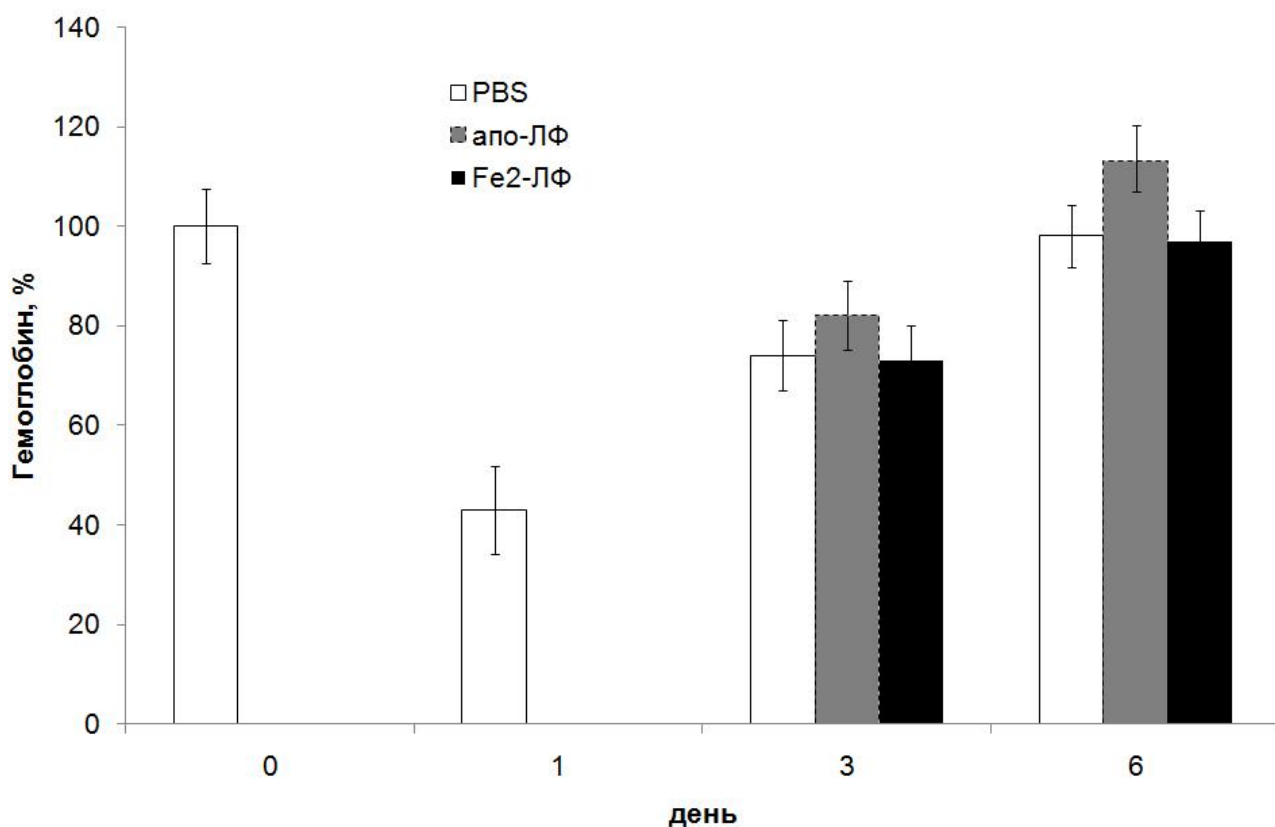


Рис. 3.4. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ на концентрацию гемоглобина у крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Наблюдалось также снижение концентрации сывороточного железа, на 3-й день после индукции анемии концентрация составила 56% от исходного уровня (Рис. 3.5).

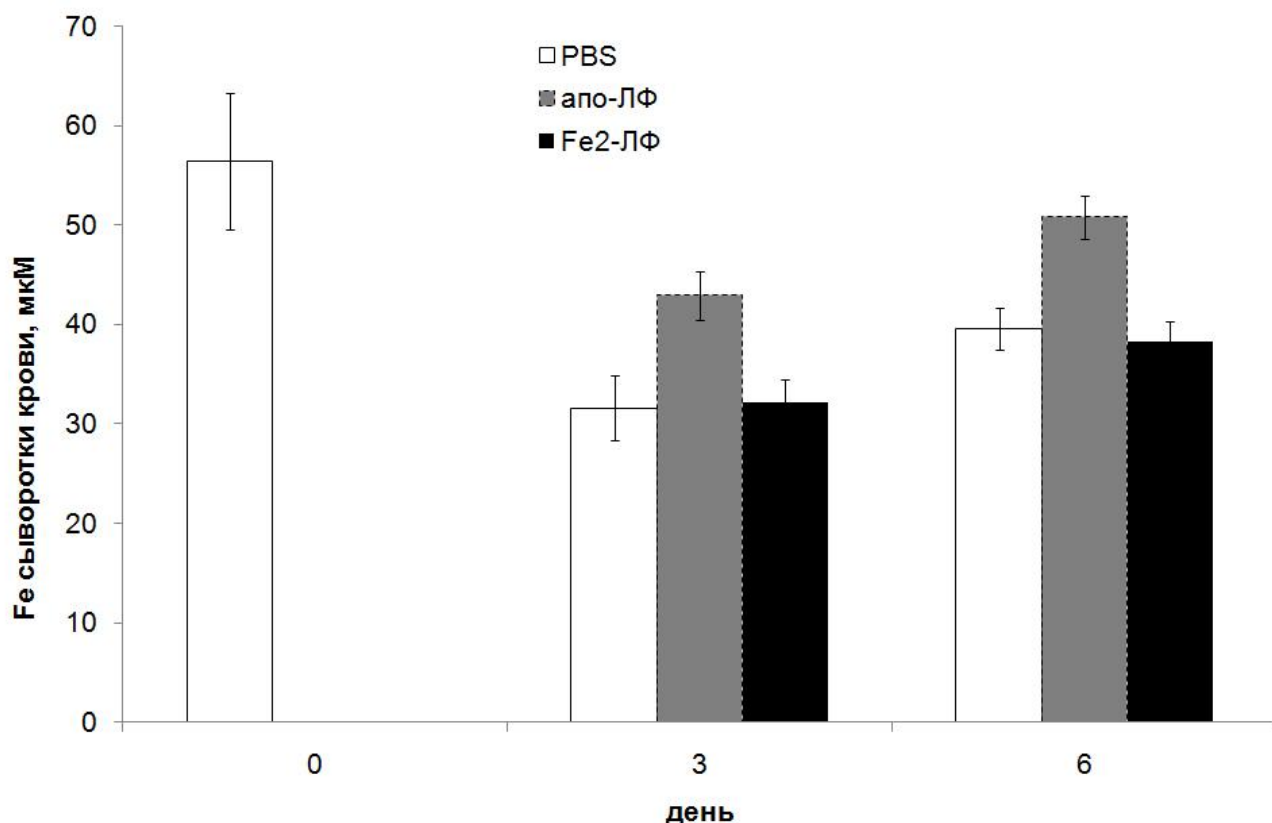


Рис. 3.5. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ и Fe₂-ЛФ на концентрацию железа в сыворотке крови крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Однократное внутрибрюшинное введение крысам апо-ЛФ в дозе 75 мг/кг на следующий день после индукции гемолитической анемии привело к восстановлению концентрации гемоглобина на 3-й и 6-й день эксперимента до 82% и 113% от исходного уровня (Рис. 3.4). У контрольных животных и крыс, получивших насыщенную железом форму ЛФ, в эти дни уровень гемоглобина составлял 74% и 98%, соответственно. Концентрация сывороточного железа у крыс, получивших 75 мг/кг апо-ЛФ, на 3-й и 6-й день эксперимента составила 76 и 90% от исходного уровня (Рис. 3.5). Ферроксидазная активность ЦП повышалась в 1,5 раза после введения крысам любой из форм ЛФ (PBS – $2,42 \pm 0,21$ мМ Fe²⁺/час, апо-ЛФ – $3,82 \pm 0,26$ мМ Fe²⁺/час; Fe₂-ЛФ – $3,91 \pm 0,19$ мМ Fe²⁺/час). Проведенные опыты с использованием железонасыщенного ЛФ позволяют предположить, что корректирующее действие ЛФ не связано с прямым воздействием на ферроксидазную активность ЦП. Поскольку обе формы ЛФ (апо-форма и насыщенная железом) активируют ферроксидазную активность ЦП, то их

эффективность могла бы быть сходной. Однако насыщенный железом ЛФ практически не восстановил параметров метаболизма железа в моделях постгеморрагической и гемолитической анемии. Этот неожиданный результат заставил выдвинуть рабочую гипотезу о том, что корректирующее действие ЛФ связано непосредственно с его свойствами как наиболее сильного из белковых хелаторов железа ($K_a \sim 10^{20}$ л/моль) [Aisen and Listowsky, 1980].

Учитывая, что для проявления защитных свойств в использованных нами моделях острой гипоксии и анемии необходимо увеличить количество эритроцитов, что было косвенно подтверждено по увеличению концентрации гемоглобина, мы изучили влияние введения различных форм ЛФ и ТФ на концентрацию железа в сыворотке крови через 1 час после введения (Рис. 3.6) и концентрацию индуктора эритропоэза, эритропоэтина (ЭПО), через сутки после внутрибрюшинного введения (Рис. 3.7).

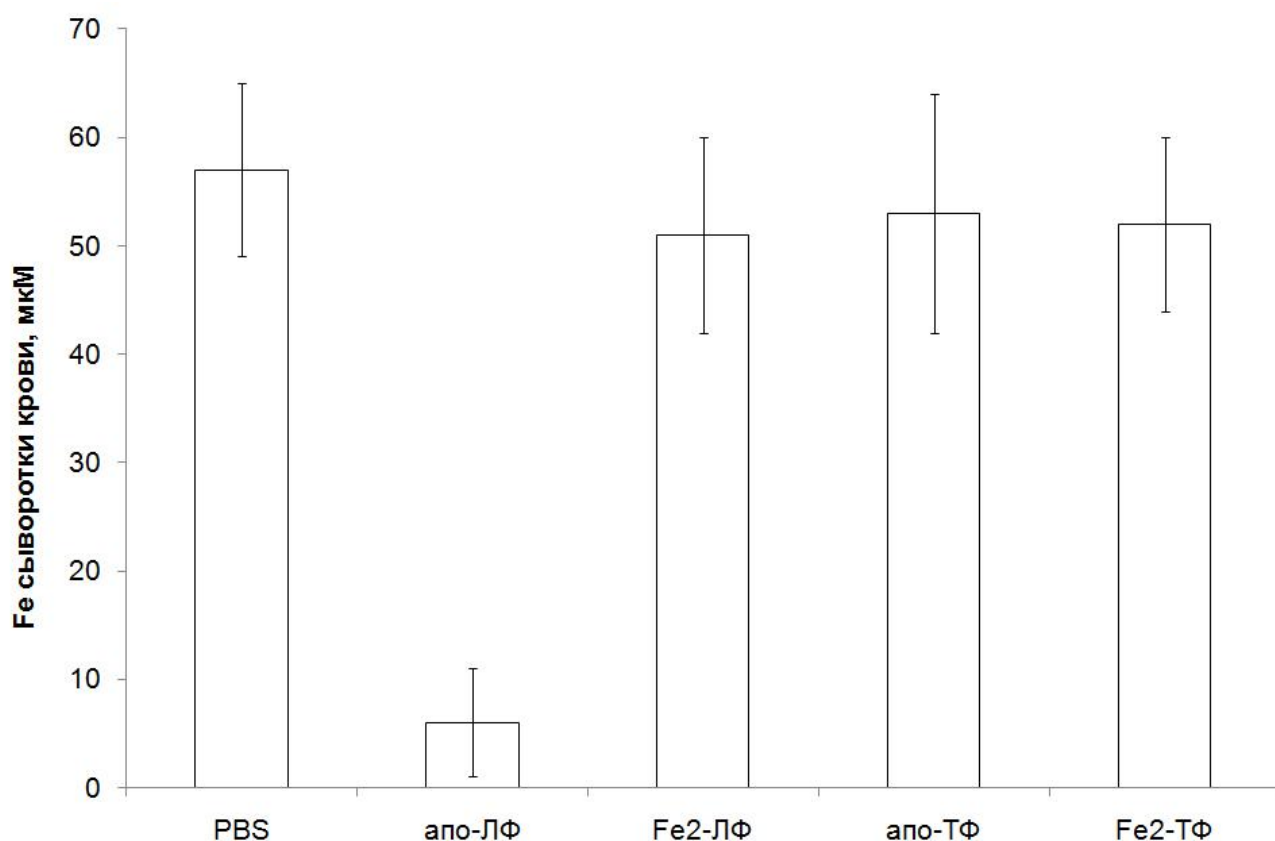


Рис. 3.6. Влияние внутрибрюшинного введения PBS, апо-ЛФ, Fe₂-ЛФ, апо-трансферрина (апо-ТФ) и Fe₂-ТФ (250 мг/кг) на концентрацию железа в сыворотке крови крыс через 1 час после внутрибрюшинного введения. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Через 1 час после введения крысам апо-ЛФ в дозе 250 мг/кг уровень сывороточного железа снизился до 9 % от исходного. Напротив, введение в той же дозе насыщенного железом ЛФ, апо- и насыщенного железом ТФ не повлияло на концентрацию железа в сыворотке (Рис. 3.6). Концентрация ЭПО на следующий день после введения апо-ЛФ увеличилась в 4,5 раза, в отличие от остальных групп крыс (Рис. 3.7).

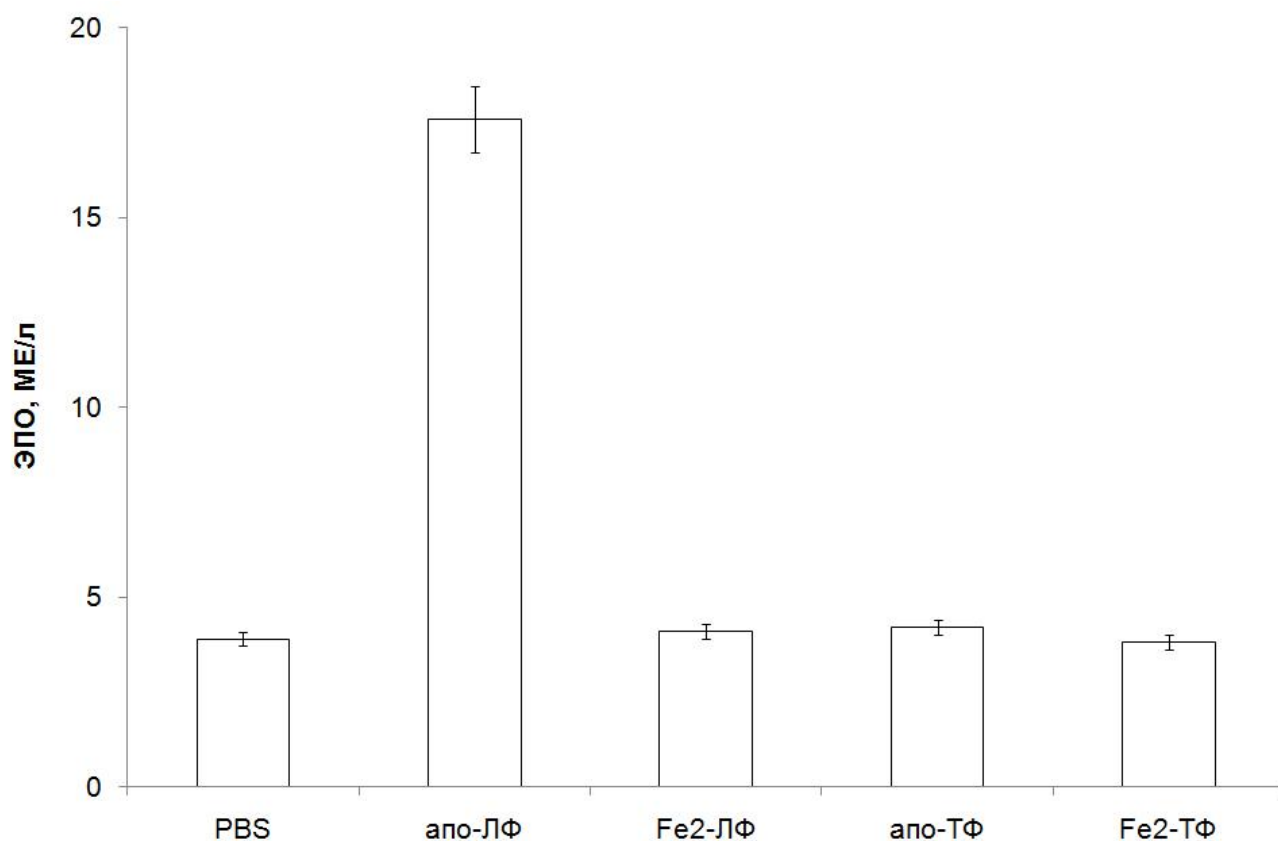


Рис. 3.7. Влияние PBS, апо-ЛФ, Fe₂-ЛФ, апо-ТФ и Fe₂-ТФ (250 мг/кг) на концентрацию ЭПО в сыворотке крови крыс через 24 часа после внутрибрюшинного введения. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Также было изучено влияние апо-ЛФ на концентрацию ЭПО в сыворотке крови после внутрибрюшинного введения мышам на более частых временных интервалах (Рис. 3.8). Так, после введения апо-ЛФ на всех временных промежутках концентрация ЭПО в сыворотке крови мышей была выше по сравнению с мышами, получившими внутрибрюшинную инъекцию PBS. При этом нельзя выделить определенного временного максимума концентрации ЭПО. Такой эффект можно объяснить относительной неоднородностью групп мышей, использованных в данном опыте.

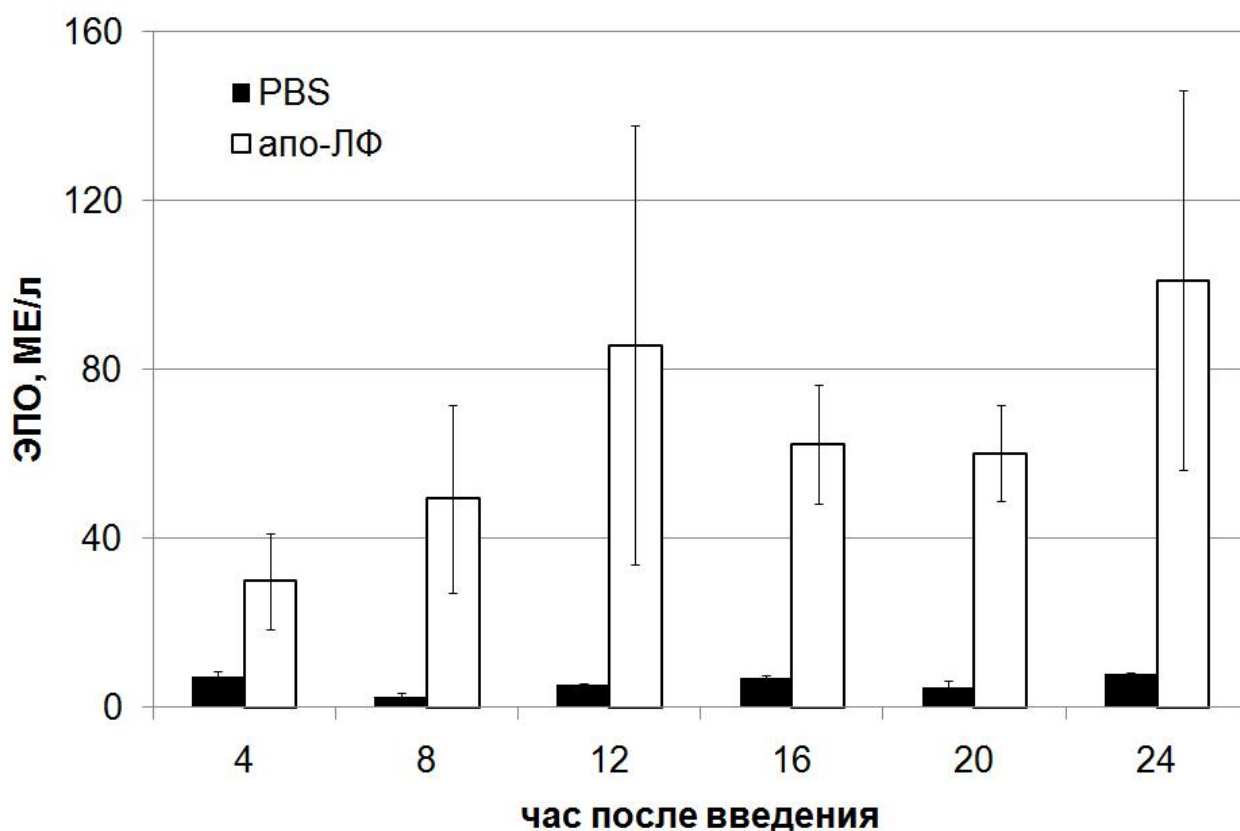


Рис. 3.8. Зависимость концентрации ЭПО в сыворотке крови мышей от времени (4-24 часа) после внутрибрюшинного введения PBS и апо-ЛФ (75 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

3.3. Исследование влияния лактоферрина на иммунореактивные гипоксия-индуцибельные факторы 1-альфа и 2-альфа, эритропоэтин и церулоплазмин в образцах тканей мышей и крыс

Учитывая, что именно апо-форма ЛФ приводила как к временному понижению концентрации железа в сыворотке крови, так и к увеличению концентрации ЭПО, одной из мишеней HIF-сигнальной системы, было решено исследовать влияние введения апо-ЛФ и насыщенной железом формы белка на присутствие в тканях животных иммунореактивных HIF-1 α и HIF-2 α и продуктов их генов-мишеней: ЦП и ЭПО. В качестве положительного контроля увеличения стабильности HIF в клетках был использован синтетический хелатор железа – DFO.

На рисунке 3.9 приведен типичный пример выявления иммунореактивного HIF-1 α в гомогенатах мозга мышей после Вестерн-блоттинга с моноклональными антителами против HIF-1 α . Иммунореактивный HIF-1 α был обнаружен на сроках 4-24 часа после внутрибрюшинного введения апо-ЛФ (75 мг/кг) мышам в печени, селезёнке, легких, сердце, почках и мозге. Положительный контроль DFO также вызвал увеличение иммунореактивного

HIF-1 α , которого практически не удалось выявить в тканях контрольных животных, получивших PBS.

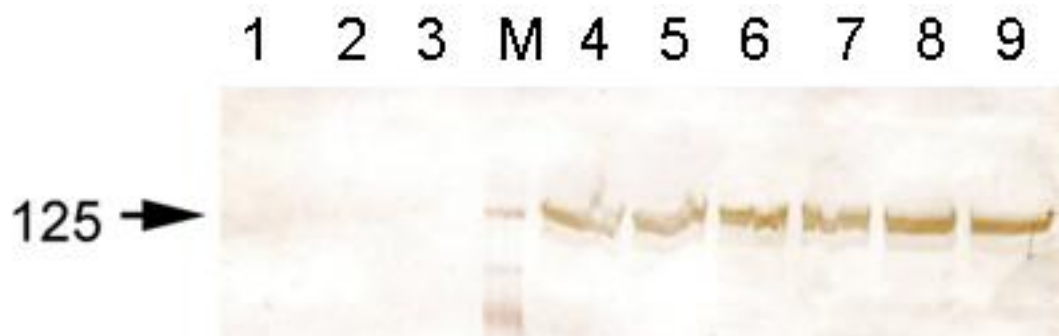


Рис. 3.9. Типичный результат выявления HIF-1 α после Вестерн-блоттинга белков гомогенатов мозга мышей (n=3), получивших за сутки PBS (1-3), DFO (4-6; 5 мг/кг) и апо-ЛФ (7-9; 75 мг/кг), на дорожку нанесено 100 мкг общего белка, М – окрашенные маркеры молекулярной массы, стрелкой указано положение полосы 125 кДа.

Продукт активации HIF-1 α , ЦП, был также обнаружен в перечисленных выше органах после введения апо-ЛФ, типичный Вестерн-блоттинг приведен на рис. 3.10.

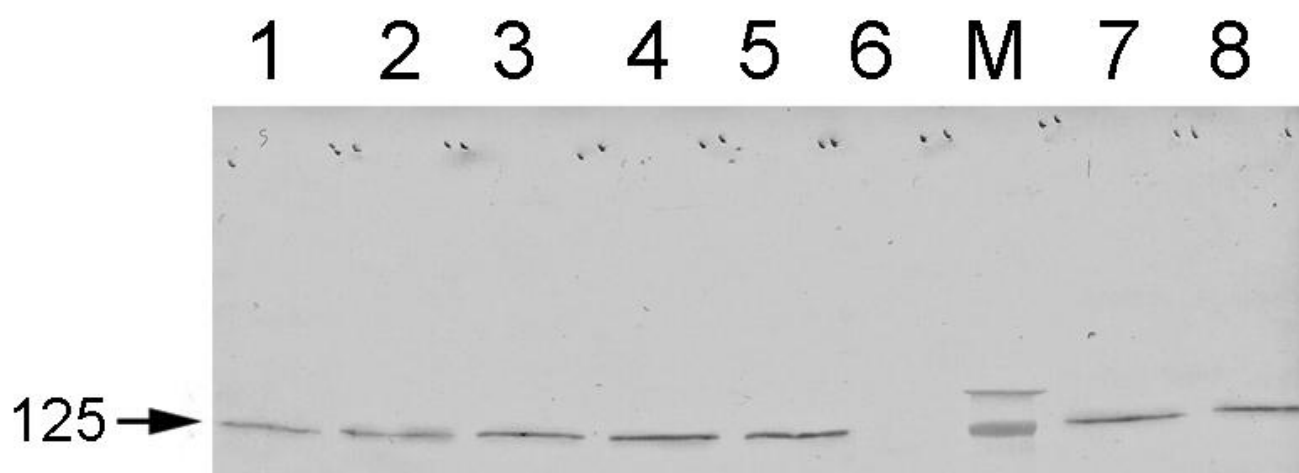


Рис. 3.10. Типичный результат выявления ЦП после Вестерн-блоттинга белков гомогенатов мозга (1), легких (2), почек (3), печени (4), селезёнки (5), сердца (7) мышей (n=3), получивших за сутки апо-ЛФ (75 мг/кг), PBS (6, гомогенат мозга), DFO (8, 5 мг/кг, гомогенат мозга), на дорожку нанесено 100 мкг общего белка, М – окрашенные маркеры молекулярной массы, стрелкой указано положение полосы 125 кДа

Аналогичным образом были выявлены HIF-2 α и продукт его активации ЭПО (типичные примеры Вестерн-блоттинга будут приведены в следующем разделе 3.4), которые также были выявлены на сроках от 4 до 24 часов после внутрибрюшинной инъекции апо-ЛФ (75 мг/кг) в

печени, селезёнке, легких, сердце, почках и мозге. Кроме внутрибрюшинного введения апо-формы ЛФ был исследован интраназальный способ введения апо-ЛФ (15 мг/кг), при котором НIF-1 α , НIF-2 α , ЦП и ЭПО были обнаружены в гомогенатах головного мозга мышей и крыс. Также были изучены последствия добавления апо-ЛФ человека и коровы (конечная концентрация 2 мг/мл) в PBS и молоко коровы, которые употребляли мыши и крысята сразу после отлучения от лактирующей самки. На 3-й и 6-й дни в тканях животных, получавших *per os* апо-ЛФ, были обнаружены иммунореактивные НIF-1 α , НIF-2 α , ЦП и ЭПО. Результаты выявления данных антигенов с помощью Вестерн-блоттинга суммированы в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Обобщенные результаты выявления иммунореактивных НIF-1 α , НIF-2 α , ЦП и ЭПО (как минимум 3 животных в группе) у мышей и крыс.

	печень	мозг	сердце	селезёнка	легкие	почки
4-24 часа после в/б* инъекции PBS	-	-	-	-	-	-
4-24 часа после в/б инъекции апо-ЛФ, 75 мг/кг	+	+	+	+	+	+
4-24 часа после в/б инъекции Fe ₂ -ЛФ, 75 мг/кг	-	-	-	-	-	-
PBS с питьем (3 и 6 дней)	-	-	-	-	-	-
PBS, содержащий 2 мг/мл апо-ЛФ, с питьем (3 и 6 дней)	+	+	+	+	+	+
Молоко коровы с питьем (3 и 6 дней)	-	-	-	-	-	-
Молоко коровы, содержащее 2 мг/мл апо-ЛФ, с питьем (3 и 6 дней)	+	+	+	+	+	+
После и/н** введения PBS (4-24 часа)	-	-	-	-	-	-
После и/н введения апо-ЛФ (4-24 часа, 15 мг/кг)	-	+	-	-	-	-

* в/б – внутрибрюшинная, ** и/н – интраназальное.

Учитывая, что, в отличие от апо-ЛФ, насыщенный железом ЛФ не вызывал стабилизации НIF и активации синтеза ЦП и ЭПО в тканях, на следующем этапе работы мы изучили, повлияет ли экспериментальное выключение ферроксидазной активности ЦП у крыс на защитные свойства апо-ЛФ.

3.4. Исследование влияния выключения ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс, получавших диету с AgCl, на защитные свойства лактоферрина

Удобной экспериментальной моделью выключения ферроксидазной активности ЦП является содержание крыс на диете с AgCl (см. раздел 2.10), однако, учитывая эмбриотоксический эффект AgCl [Shavlovski et al., 1995], было решено вводить AgCl в пищу сразу после рождения интактными самками крысят. Измерение содержания Ag в молоке лактирующих крыс на 2-й и 8-й день лактации показало наличие 8 ± 2 и 10 ± 2 мкг Ag на 1 мл цельного молока, соответственно. В молоке контрольных самок не было выявлено серебра. После трех месяцев вскармливания крыс AgCl мы не выявили статистически достоверных отличий по весу (212 ± 12 г, $n=246$) от контрольных крыс того же возраста (214 ± 23 г, $n=238$). В опыте были использованы только самцы, а самки были подвергнуты эфирному наркозу, декапитации и из их сыворотки были выделены препараты ЦП (см. раздел 2.6.1). Данные о постадийной очистке препаратов ЦП из сыворотки контрольных и Ag-крыс суммированы в Таблице 3.2.

Таблица 3.2.

Данные о постадийной очистке ЦП из сыворотки контрольных и Ag-крыс

Стадия	Общий белок, мг	Активный (по <i>n</i> -фенилендиамину)/иммунореактивный ЦП (ракетный иммуно-ЭФ), мг/мг	A_{610}/A_{280}	Выход, %
1. Сыворотка контрольных крыс	12500	89/89	-	100
2. UNO Sphere Q	550	79/79	0.006	89
3. Неомицин-агароза	74	74/74	0.054	83
1. Сыворотка Ag-крыс	7400	4/60	-	100
2. UNO Sphere Q	89	3.4/55	0.011	92
3. Неомицин-агароза	52	3.2/51	0.018	85

Следует отметить, что ЦП, выделенный из сыворотки Ag-крыс, отличался в 3 раза меньшим соотношением A_{610}/A_{280} , несмотря на чистоту более 98%. Определение содержания ионов меди и серебра в препаратах ЦП показало наличие $5,8 \pm 0,3$ атомов Cu на молекулу ЦП из сыворотки контрольных крыс и $3,9 \pm 0,2$ атомов Cu и $2,1 \pm 0,3$ атомов Ag на молекулу ЦП из сыворотки Ag-крыс. Таким образом, можно предположить, что ЦП из сыворотки Ag-крыс содержал вместо двух ионов меди I типа (обуславливающих поглощение при A_{610}) два иона серебра. Вероятно, именно поэтому препарат ЦП из сыворотки Ag-крыс не обладал феррооксидазной активностью и проявлял в 16 раз меньшую удельную *n*-фенилендиамин-оксидазную активность по сравнению с ЦП из сыворотки контрольных крыс. На полученной модели мы исследовали, насколько феррооксидазная функция ЦП важна для восстановления ключевых параметров метаболизма железа при постгеморрагической анемии. До начала опыта концентрация меди в сыворотке Ag-крыс составила 11 ± 2 мкМ, что почти в 2 раза меньше, чем у контрольных крыс - 19 ± 3 мкМ. Концентрация железа в сыворотке Ag-крыс была в 1,4 раза ниже, чем в контрольной группе (39 ± 4 и 56 ± 11 мкМ).

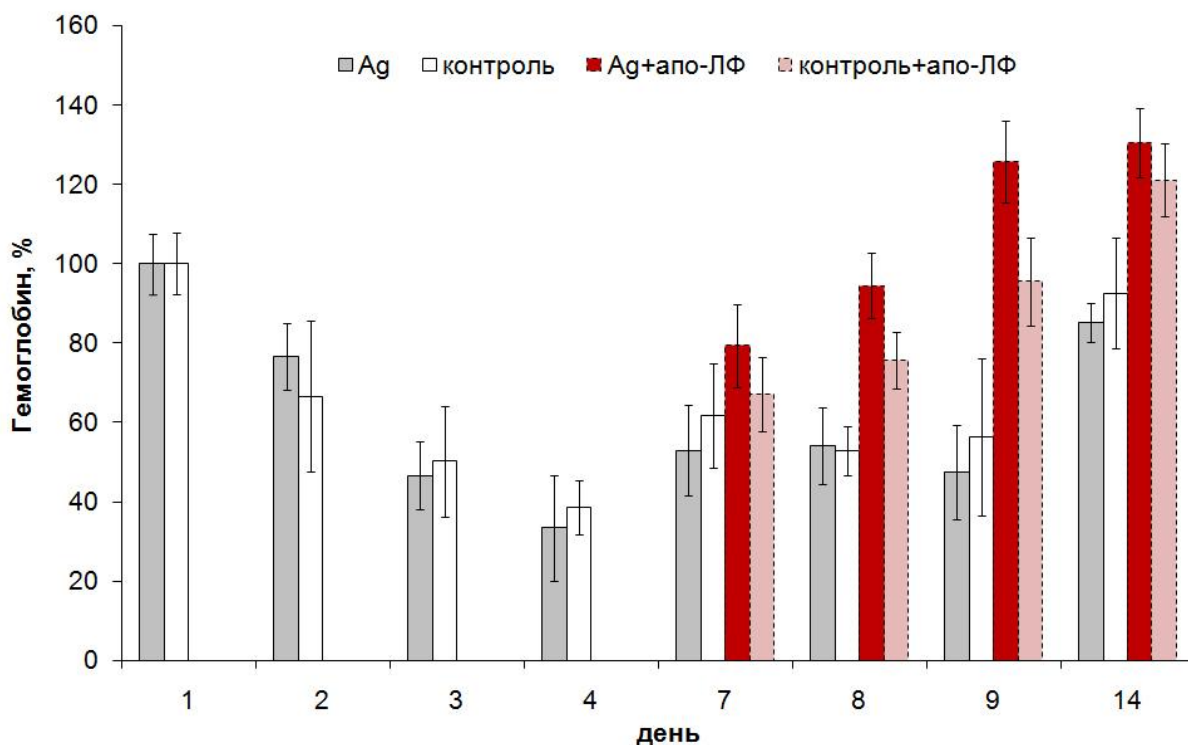


Рис. 3.11. Влияние внутрибрюшинного введения PBS либо апо-ЛФ (5-й-7-й дни) на концентрацию гемоглобина у контрольных и Ag-крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й-4-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

В течение четырех ежедневных заборов крови мы наблюдали монотонное снижение содержания гемоглобина и концентрации сывороточного железа у крыс в обеих группах (Рис. 3.11 и 3.12).

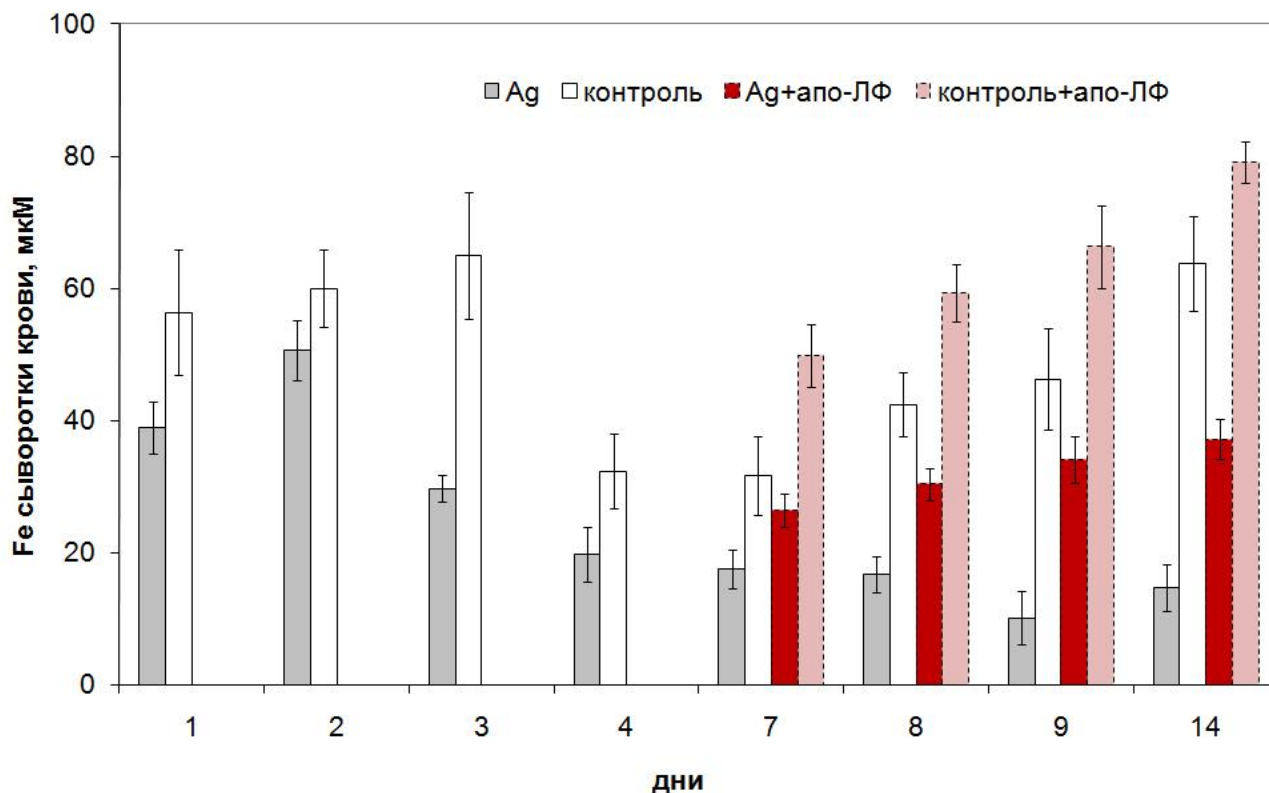


Рис. 3.12. Влияние внутрибрюшинного введения PBS либо апо-ЛФ (5-й–7-й дни) на концентрацию Fe в сыворотке крови контрольных и Ag-крыс, подвергнутых острой постгеморрагической анемии (заборы крови в 1-й–4-й дни). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

После окончания массивных заборов крови уровень гемоглобина практически восстановился до исходного уровня у крыс в обеих группах к 14-му дню без статистически достоверных различий (Рис. 3.11). Напротив, концентрация железа в сыворотке у Ag-крыс не только не восстановилась до прежнего уровня, но даже уменьшилась (10 ± 3 и 46 ± 10 мкМ на 9-й день у Ag-крыс и контрольной группы, соответственно). К 14 дню эксперимента концентрация сывороточного железа у Ag-крыс была в 4,5 раза ниже, чем у контрольных крыс (Рис. 3.12). Таким образом, несмотря на фатальное снижение концентрации железа, Ag-крысы восстановили уровень гемоглобина с той же динамикой, что и крысы контрольной группы. Ежедневное введение апо-ЛФ (75 мг/кг) половине контрольных и Ag-крыс после последней

кровопотери (на 5, 6 и 7 день) привело к восстановлению концентрации сывороточного железа в отличие от Ag-крыс, которым не вводили апо-ЛФ.

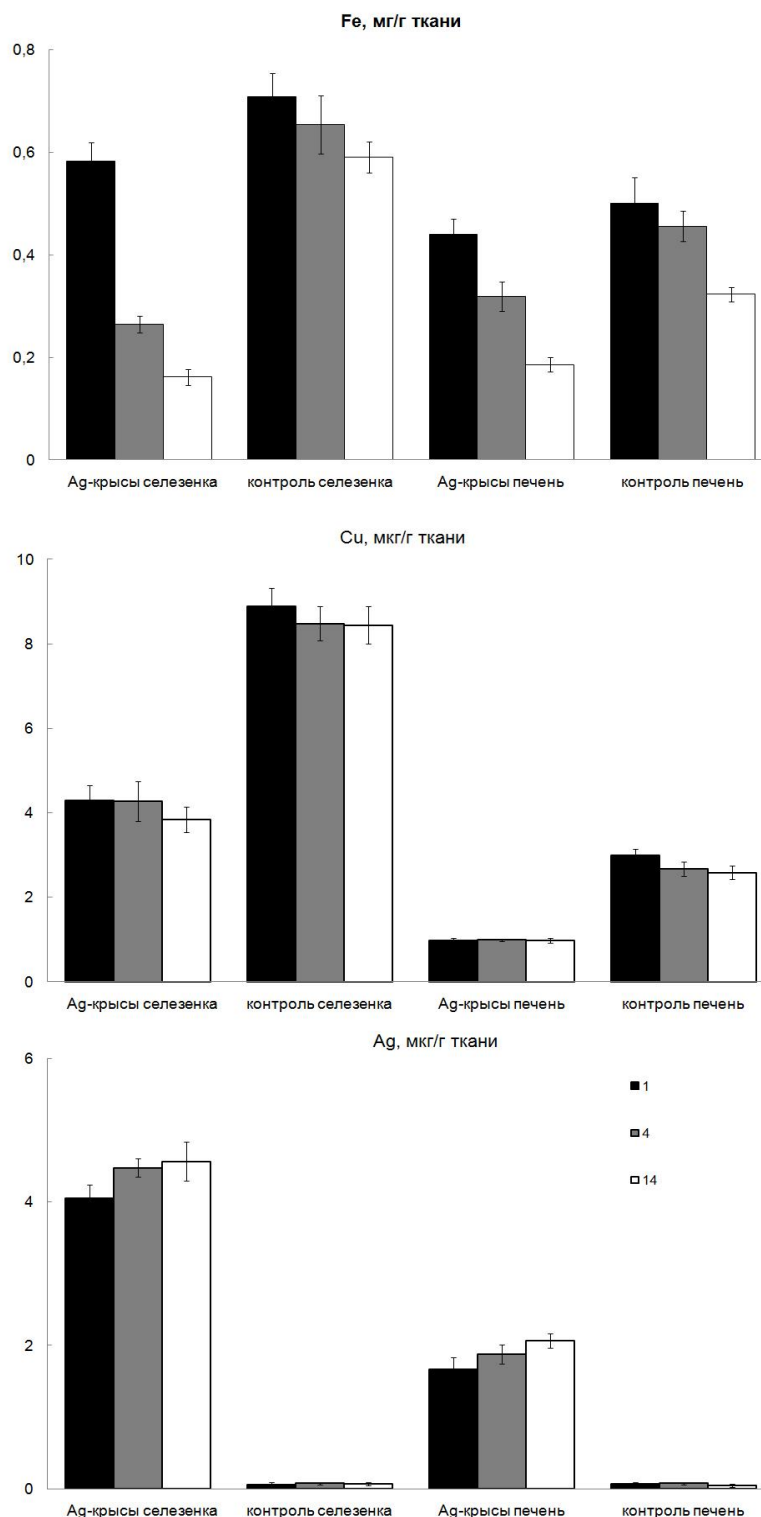


Рис. 3.13. Содержание Fe, Cu и Ag в селезенке и печени крыс на 1, 4 и 14 дни острой постгеморрагической анемии. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

У Ag-крыс, получавших апо-ЛФ, на 14-й день концентрация железа составила 37 ± 3 мкМ, т.е. достигла исходного уровня (Рис. 3.12). Содержание гемоглобина у Ag-крыс, получавших ЛФ, уже на 9-й день составило 125% (Рис. 3.11). У Ag-крыс в течение всего эксперимента не наблюдалось проявления как ферроксидазной, так и аминоксидазной (в отношении *n*-фенилендиамина) активности ЦП. Таким образом, восстановление концентрации железа до исходного уровня нельзя было объяснить действием апо-ЛФ на ферроксидазную активность ЦП. Более того, апо-ЛФ быстрее купировал анемию у крыс с дефицитом ферроксидазной активности ЦП.

Измерение содержания Ag, Cu и Fe в депо железа – печени и селезенке – у крыс на 1-й, 4-й и 14-й дни эксперимента показали разительные различия содержания этих металлов в органах (Рис. 3.13). Содержание Ag в печени и селезенке Ag-крыс достигало около 2 и 4 мкг на 1 г тканей, соответственно, с тенденцией к повышению в течение опыта. Содержание Cu в печени и селезенке Ag-крыс было в 2,5 и 2 раза ниже, чем в контрольной группе, соответственно, и практически не изменилось в обеих группах. Содержание Fe в печени и селезенке у Ag-крыс было несколько ниже, чем у крыс контрольной группы в первый день опыта, но если контрольные крысы на 14-й день истощили запасы железа в печени и селезенке на 35% и 16%, то Ag-крысы истощили депо Fe на 58% и 72%, соответственно.

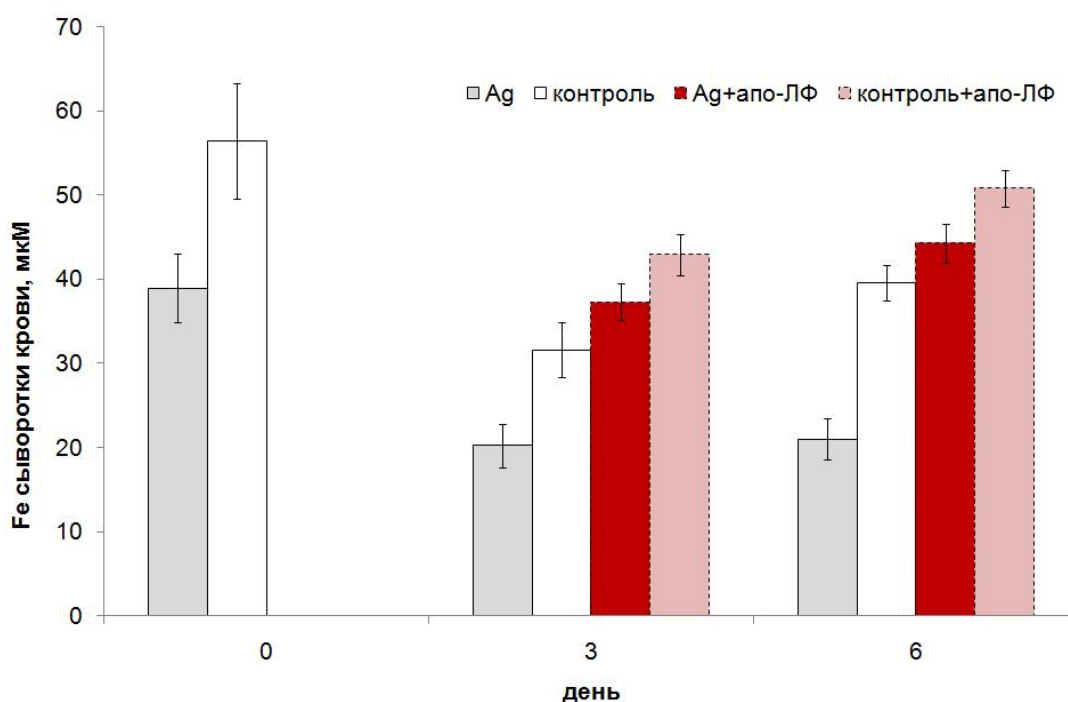


Рис. 3.14. Влияние внутрибрюшинного введения PBS и апо-ЛФ на концентрацию Fe в сыворотке крови крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Сравнение защитного эффекта апо-ЛФ проводили и для гемолитической анемии: Ag-крысы после индукции гемолитической анемии, также как и контрольные, восстановили уровень гемоглобина до исходного на 6-й день, однако, концентрация железа на 6-й день продолжала составлять не более 54% от исходной (Рис. 3.14).

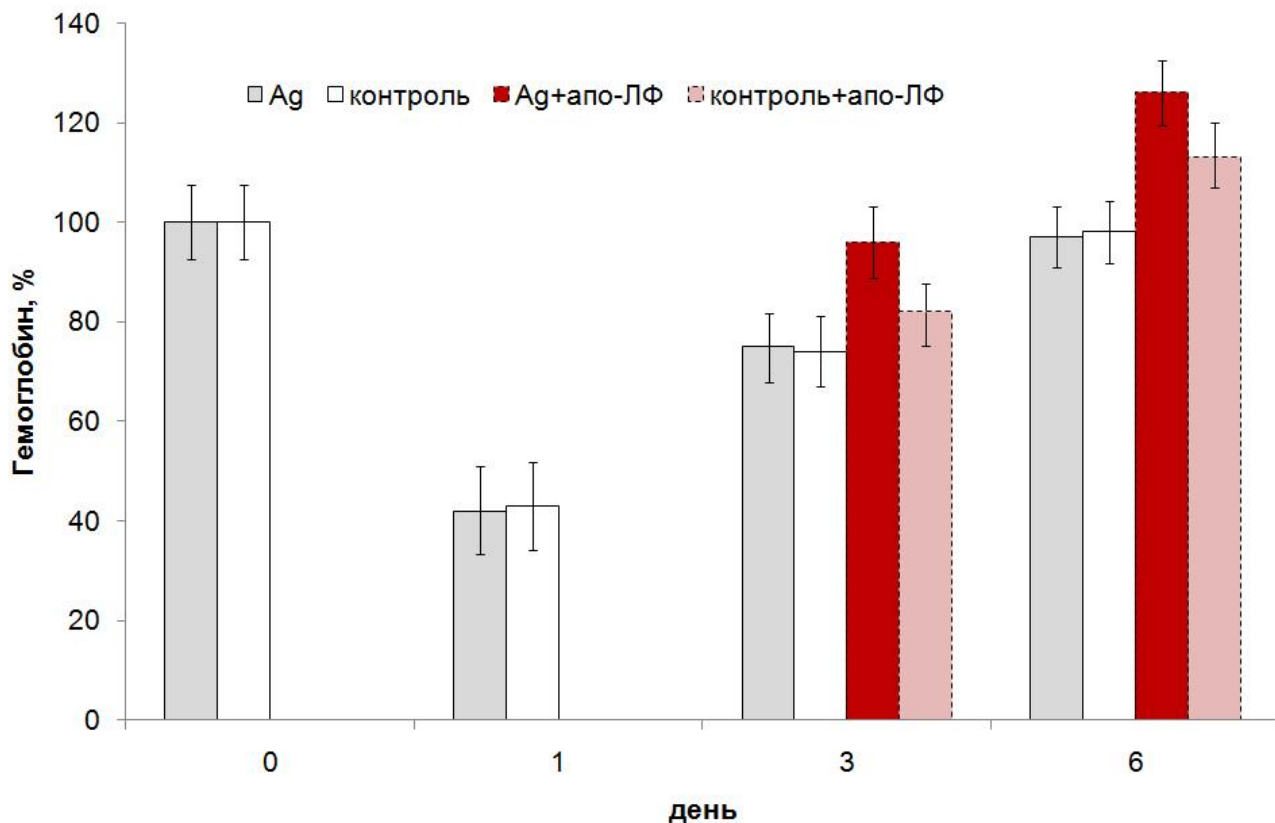


Рис. 3.15. Влияние внутрибрюшинного введения PBS и апо-ЛФ на концентрацию гемоглобина у крыс, подвергнутых гемолитической анемии (введение фенилгидразина 250 мг/кг). Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

Однократное внутрибрюшинное введение Ag-крысам апо-ЛФ в дозе 75 мг/кг на следующий день после индукции гемолитической анемии привело к восстановлению концентрации гемоглобина на 3-й и 6-й дни эксперимента до 96% и 126 % от исходного уровня, что было выше, чем у контрольных крыс, получивших апо-ЛФ. Концентрация сывороточного железа у Ag-крыс, получивших 75 мг/кг апо-ЛФ, на 3-й и 6-й дни эксперимента составила 96% и 114% от исходного уровня (Рис. 3.14).

Дополнительные эксперименты, проведенные на Ag-крысах, с использованием железонасыщенного ЛФ, показали, что он практически не восстановил параметров метаболизма железа в моделях постгеморрагической и гемолитической анемии (данные не приведены).

В независимых экспериментах при сравнении эффекта внутрибрюшинного введения 75 мг/кг апо-ЛФ контрольным и Ag-крысам, мы показали, что Ag-крысы демонстрируют 3-х дневную стабилизацию HIF-1 α и HIF-2 α (Рис. 3.16, Таблица 3.3).

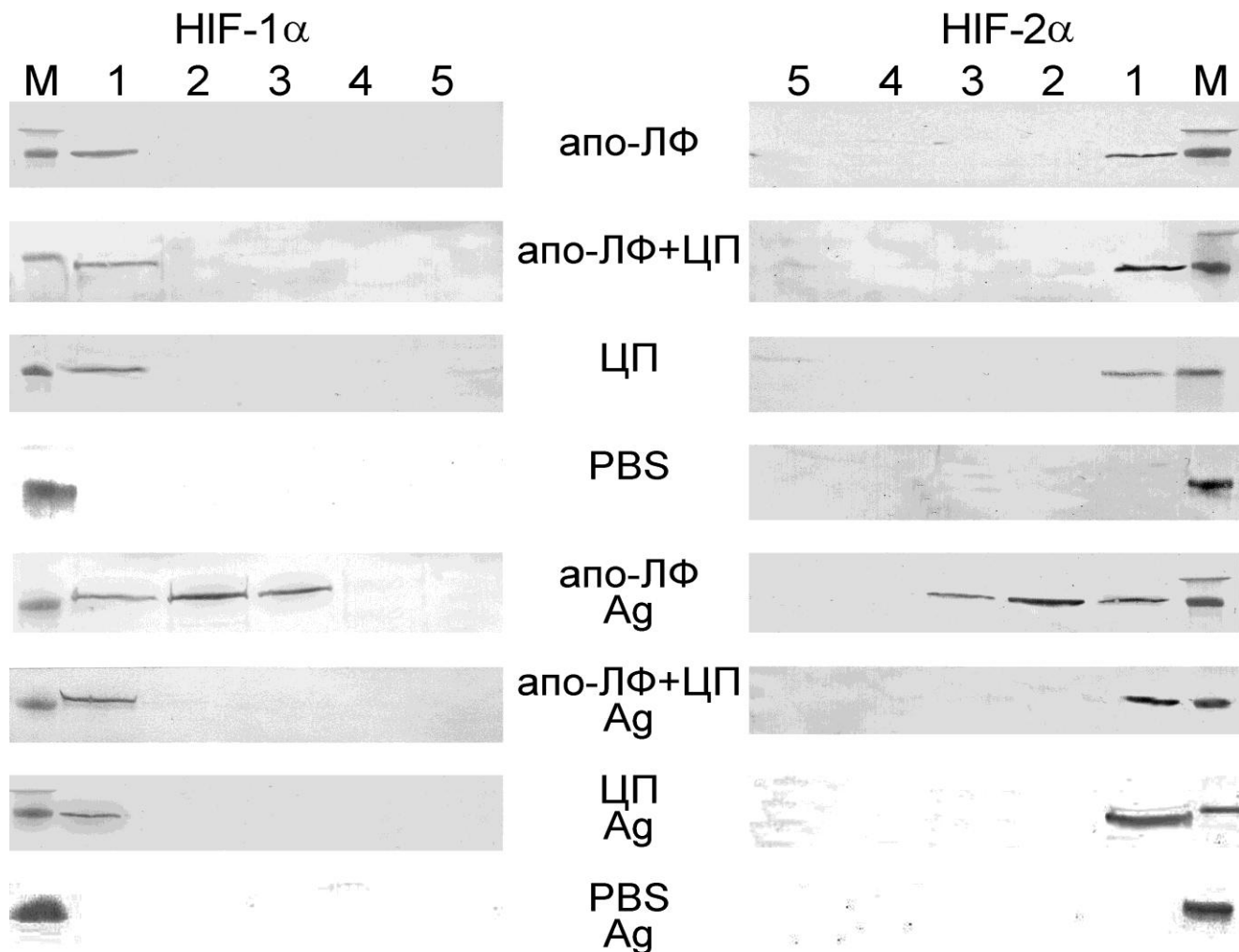


Рис. 3.16. Типичный пример выявления иммунореактивных HIF-1 α и HIF-2 α при Вестерн-блоттинге белков гомогенатов мозга крыс через 1-5 дней после внутрибрюшинной инъекции 75 мг/кг апо-ЛФ, 100 мг/кг ЦП, двух белков либо PBS. 100 мкг белка на дорожку, М – окрашенный маркер молекулярной массы, номера 1, 2, 3, 4, 5 соответствуют дням после инъекции.

Введение Ag-крысам вместе с апо-ЛФ активного ЦП препятствовало пролонгированию защитных свойств апо-ЛФ, сокращая время стабилизации HIF до 1 дня, как и у крыс, получивших только активный ЦП. Введение Ag-крысам вместе с апо-ЛФ активного ЦП также препятствовало выраженному увеличению концентрации ЭПО в их сыворотке крови. Так, концентрация ЭПО у Ag-крыс получивших ЦП и апо-ЛФ не возрастала сильнее, чем у контрольных крыс, получивших ЦП (Рис. 3.17). Недавно появились данные о способности ЦП индуцировать HIF-сигнальный путь [Dai *et al.*, 2016].

Таблица 3.3.

НIF-1 α и НIF-2 α в печени и мозге контрольных и Ag-крыс через 1-5 дней после в/б инъекции 75 мг/кг апо-ЛФ, 100 мг/кг ЦП, двух белков либо PBS по данным Вестерн-блоттинга

Группа/день после инъекции	1	2	3	4	5
Контроль – апо-ЛФ	+	-	-	-	-
Контроль – апо-ЛФ+ЦП	+	-	-	-	-
Контроль – ЦП	+	-	-	-	-
Контроль – PBS	-	-	-	-	-
Ag-крысы – апо-ЛФ	+	+	+	-	-
Ag-крысы – апо-ЛФ+ЦП	+	-	-	-	-
Ag-крысы – ЦП	+	-	-	-	-
Ag-крысы – PBS	-	-	-	-	-

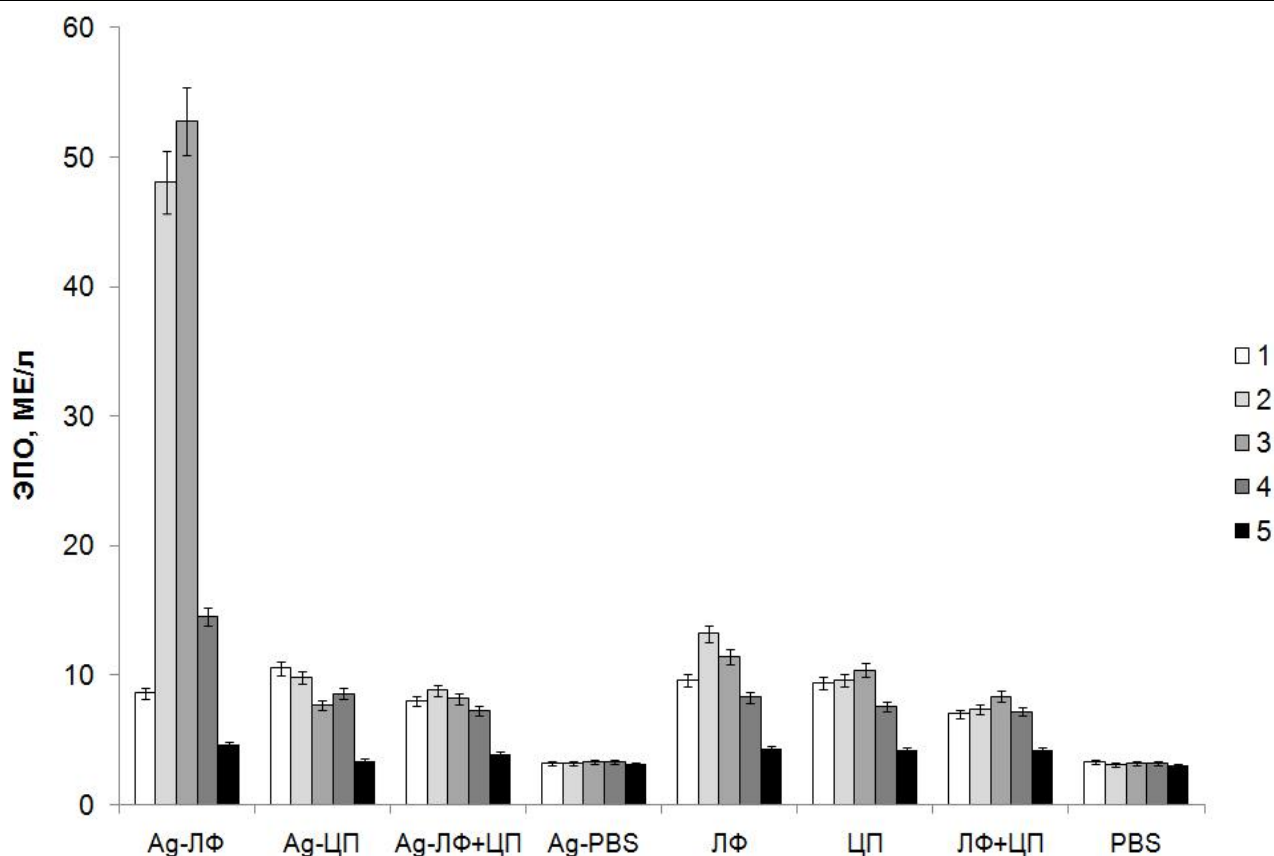


Рис. 3.17. Концентрация ЭПО в сыворотке Ag-крыс и контрольных крыс через 1-5 дней после внутрибрюшинной инъекции 75 мг/кг апо-ЛФ, 100 мг/кг ЦП, двух белков либо PBS. Данные представлены как среднее и доверительный интервал ($\alpha=0.05$).

3.5. Исследование влияния введения апо-лактоферрина беременным и лактирующим крысам на стабильность гипоксия-индуцибельных факторов у их потомства

Внутрибрюшинное введение апо-ЛФ (75 и 250 мг/кг) беременным крысам показало наличие иммунореактивных HIF-1 α и HIF-2 α в мозге, печени, селезенке и плаценте самок, в то же время в тканях эмбрионов не наблюдалось наличия иммунореактивных HIF. Кроме того, в мозге и плаценте был обнаружен иммунореактивный ЭПО. Введение насыщенного ионами железа ЛФ беременным крысам не вызывало стабилизации HIF и индукции синтеза ЭПО у самок и эмбрионов (Рис. 3.18).



Рис. 3.18. Типичный пример выявления иммунореактивного ЭПО при Вестерн-блоттинге белков гомогенатов плацент крыс после внутрибрюшинной инъекции 250 мг/кг апо-ЛФ (1-4), 250 мг/кг насыщенного железом ЛФ (5,6) либо PBS (7,8). 100 мкг белка на дорожку, Э – 0,5 мкг ЭПО (положительный контроль).

При внутрибрюшинном введении лактирующим самкам крыс апо-ЛФ (250 мг/кг) через 3-24 часа было обнаружено наличие HIF-1 α и HIF-2 α , а также ЭПО в мозге, печени и селезенке крысят. Такого эффекта у потомства не обнаруживалось в случае инъекции PBS либо насыщенного железом ЛФ лактирующим крысам. Хотя вне зависимости от насыщения железом ЛФ был выявлен как недеградированная 78-кДа зона (и фрагмент с молекулярной массой 50 кДа) в содержимом желудков крысят, подвергнутых анализу. При более детальном анализе наличие ЛФ человека в молоке крыс было показано на сроках от 4 до 24 часов после внутрибрюшинного введения (250 мг/кг), на тех же сроках была обнаружена стабилизация HIF-1 α и HIF-2 α , а также ЭПО в мозге (Рис. 3.19), печени и селезенке крысят, чьи матери получали внутрибрюшинно апо-ЛФ, но не PBS.

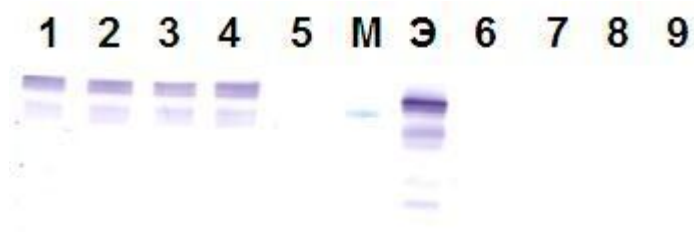


Рис. 3.19. Типичный пример выявления иммуореактивного ЭПО при Вестерн-блоттинге белков гомогенатов мозга крысят, вскармливаемых самками, получившими внутрибрюшинно инъекции 250 мг/кг апо-ЛФ (1-4 – через 3, 4, 8 и 24 ч после инъекции), PBS (5), 250 мг/кг насыщенного железом ЛФ (6-8 – через 3, 4, 8 и 24 ч после инъекции) 100 мкг белка на дорожку, Э – 0,5 мкг ЭПО (положительный контроль), М – полоса 40 кДа.

В эксперименте после рождения потомства самки крыс имели неограниченный доступ к питьевой воде (контрольная группа) и воде с добавлением 5 мг/мл апо-ЛФ либо насыщенной железом формы ЛФ человека. После 3 дней вскармливания у крысят анализировали наличие иммуореактивных ЭПО, HIF-1 α и HIF-2 α в мозге, печени и селезенке. Стабилизация HIF-1 α и HIF-2 α и индукция ЭПО была обнаружена только у тех детенышей, чьи матери получали с питьевой водой апо-ЛФ. Таким образом, индукция HIF-сигнальной системы была обнаружена нами у потомства крыс, получавших апо-форму ЛФ внутрибрюшинно и *per os*.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты отсроченного (через 24 часа) антигипоксического действия апо-ЛФ, но не насыщенной железом формы белка (Рис. 3.1), при острой гипоксии с гиперкапнией заставили нас предположить активацию экспрессии адаптивных генов за счёт хелаторных свойств апо-ЛФ, несмотря на то, что ЛФ – необычайно полифункциональный белок [Brock, 2002]. Учитывая, что в ряде работ сравнивались свойства ЛФ и хелатора железа DFO, который является фармакологическим миметиком гипоксии, вызывающим стабилизацию HIF-1 α , мы провели серию опытов, показавших, что апо-ЛФ, как и DFO, вызывает стабилизацию HIF-1 α и увеличение экспрессии его гена-мишени, ЦП (Рис. 3.9 и 3.10). Таким образом, если DFO называют фармакологическим миметиком гипоксии, то апо-форму ЛФ можно назвать физиологическим миметиком гипоксии. Следует, однако, отметить, что спектр и характер экспрессии генов, активируемых в ответ на гипоксию и введение хелаторов, могут сильно различаться. Во-первых, стабилизация HIF-1 α в случае гипоксии происходит практически мгновенно [Jewell *et al.*, 2001], в то время как DFO вызывает стабилизацию HIF-1 α через 4 часа [Wang and Semenza, 1993]. Во-вторых, выявлены различия в экспрессии генов под действием хелаторов в зависимости от степени их липофильности и культуры тестируемых клеток [Saletta *et al.*, 2009, Vengellur *et al.*, 2005]. В-третьих, хотя миметики гипоксии вызывают стабилизацию HIF-1 α , который может способствовать росту опухолей [Semenza, 2010], их хелаторные свойства препятствуют онкогенезу [Hoke *et al.*, 2005, Whitnall *et al.* 2006]. Наконец, опыты с разным временем экспозиции животных в условиях гипоксии и в зависимости от характера гипоксии (острая, умеренная или хроническая гипоксия) показывают различия в спектре активируемых генов [Baze *et al.*, 2010]. Суммируя вышесказанное, можно заключить, что миметики гипоксии могут отличаться от физиологической гипоксии по спектру, характеру и времени экспрессии адаптационных генов. Действительно, у добровольцев после острого либо хронического воздействия пребывания на высоте в горах (3400-5400 м над уровнем моря) уровень ЭПО существенно увеличивался на 16 часов [Piperino *et al.*, 2011], а при введении DFO в условиях нормоксии уровень ЭПО увеличивался в разной степени и в разные промежутки времени, от 4 до 24 часов [Ren *et al.*, 2000]. Похожие результаты были получены нами на мышах, поскольку после введения апо-ЛФ максимальный уровень ЭПО у разных животных также приходился на разные промежутки времени в пределах 24 часов (Рис. 3.8).

В обзоре литературы было отмечено, что ЛФ и DFO обладают рядом сходных свойств (см. раздел 1.8 и Таблицу 1.4). С учетом полученных нами результатов, оба агента стабилизируют HIF-1 α и HIF-2 α . Нами была показана эффективность апо-формы ЛФ при постгеморрагической и гемолитической анемии (см. раздел 3.2). Известно, что гипоксия активирует целый ряд генов,

ответственных за запасание железа и эритропоэз: ТФ и его рецептор, ЭПО, ЦП, ферритин, а также GDF15 [Elvidge *et al.*, 2006]. Последний снижает продукцию гепсидина, способствующего развитию дефицита железа [Tanno *et al.* 2007], чем можно объяснить противоанемический эффект DFO, вызывающего экспрессию GDF15 *in vitro*, на культурах клеток [Saletta *et al.*, 2009] и *in vivo*, при введении DFO добровольцам [Lakhal *et al.*, 2009]. Возможно, что противоанемический эффект апо-формы ЛФ также связан с индукцией GDF15.

Одним из негативных аспектов, связанных с HIF-1 α , является его присутствие практически во всех опухолевых клетках. Ингибиторы HIF-1 α являются эффективными противоопухолевыми агентами [Semenza, 2010]. Одной из мишеней HIF-1 α является VEGF, обеспечивающий снабжение опухолевых клеток питательными веществами, поступающими по капиллярам. Однако, известно, что хелаторы железа, и DFO в том числе, обладают противоопухолевой активностью [Hoke *et al.*, 2005, Whitnall *et al.*, 2006, Kovacevic *et al.*, 2011]. Более того, многочисленные противоопухолевые эффекты ЛФ, а именно, индукция апоптоза раковых клеток, ингибирование ангиогенеза, модулирование активности ферментов, метаболизирующих канцерогены, а также связывание железа [Parody, 2007; Tsuda *et al.*, 2010], говорят в пользу того, что апо-ЛФ едва ли способен потенцировать опухолевый рост за счет стабилизации HIF-1 α .

Хотя в литературе имеются сведения о прямом связывании ЛФ с ДНК и обнаружении специфических участков связывания ЛФ [He and Furmanski, 1995], нет данных о различии в связывании с ДНК для апо- и холо-форм ЛФ. Более того, было показано, что ЛФ не связывается с ДНК клеток K562 и Сасо-2 и не локализуется в ядре [Mulligan *et al.*, 2006]. Таким образом, мы предполагаем, что ЛФ является скорее активатором адаптационных транскрипционных факторов, чем непосредственно транскрипционным фактором.

В настоящее время мы можем предложить гипотетические схемы, по крайней мере, с двумя возможными механизмами стабилизации HIF-1 α под действием ЛФ: Fe-зависимым (Рис. 4.1) и Fe-независимым путем (Рис. 4.2). Известно, что HIF-1 α конститутивно синтезируется во всех типах клеток (Рис. 4.1, 1): в случае нормоксии и нормальной концентрации внутриклеточного железа HIF-1 α гидроксيليруется PHD по остаткам P402 и P564 (Рис. 4.1, 2) и FHN по остатку N803 (Рис. 4.1, 3). В последнем случае HIF-1 α с гидрокселированным N803 не может взаимодействовать с коактиватором p300/CBP, является транскрипционно неактивным и после гидрокселирования по остаткам пролина взаимодействует с pVHL (Рис. 4.1, 4), что способствует его убиквитинилированию и последующей протеасомной деградации (Рис. 4.1, 5). В условиях гипоксии или дефицита внутриклеточного железа, которое может связываться апо-ЛФ или DFO, процесс гидрокселирования HIF-1 α блокируется (Рис. 4.1, 6). В этом случае HIF-

1 α транспортируется в ядро (Рис. 4.1, 7), где, связываясь с конститутивными факторами HIF-1 β и p300/CBP, запускает транскрипцию генов-мишеней (Рис. 4.1, 8), содержащих гипоксия-респонсивные элементы (HRE) [Lee *et al.*, 2004]. Интересно, что сродство апо-ДФО и апо-ТФ к ионам железа (III) существенно не отличается ($K_a \sim 10^{22} \text{ M}^{-1}$ [Aisen and Listowsky, 1980; Aisen and Harris, 1989]), хотя и ниже, чем для DFO ($K_d \sim 10^{-31} \text{ M}^{-1}$ [Keberle, 1964]), при этом все три агента вызывают стабилизацию HIF-1 α , хотя для апо-ТФ это было показано только на культуре клеток [Chen-Roetling *et al.*, 2011]. Недавно было показано, что DFO индуцирует лизосомальную деградацию ферритина и при этом понижает пул внутриклеточного железа, связывая железо, освобожденное из ферритина в лизосомах [De Domenico *et al.*, 2009]. Учитывая, что апо-ДФО способен связывать по крайней мере 50% внутриклеточного железа ферритина [Birgens, 1994], можно предположить, что именно таким образом он уменьшает активность Fe-зависимых гидроксилаз (PHD и FIH) и способствует стабилизации HIF-1 α .

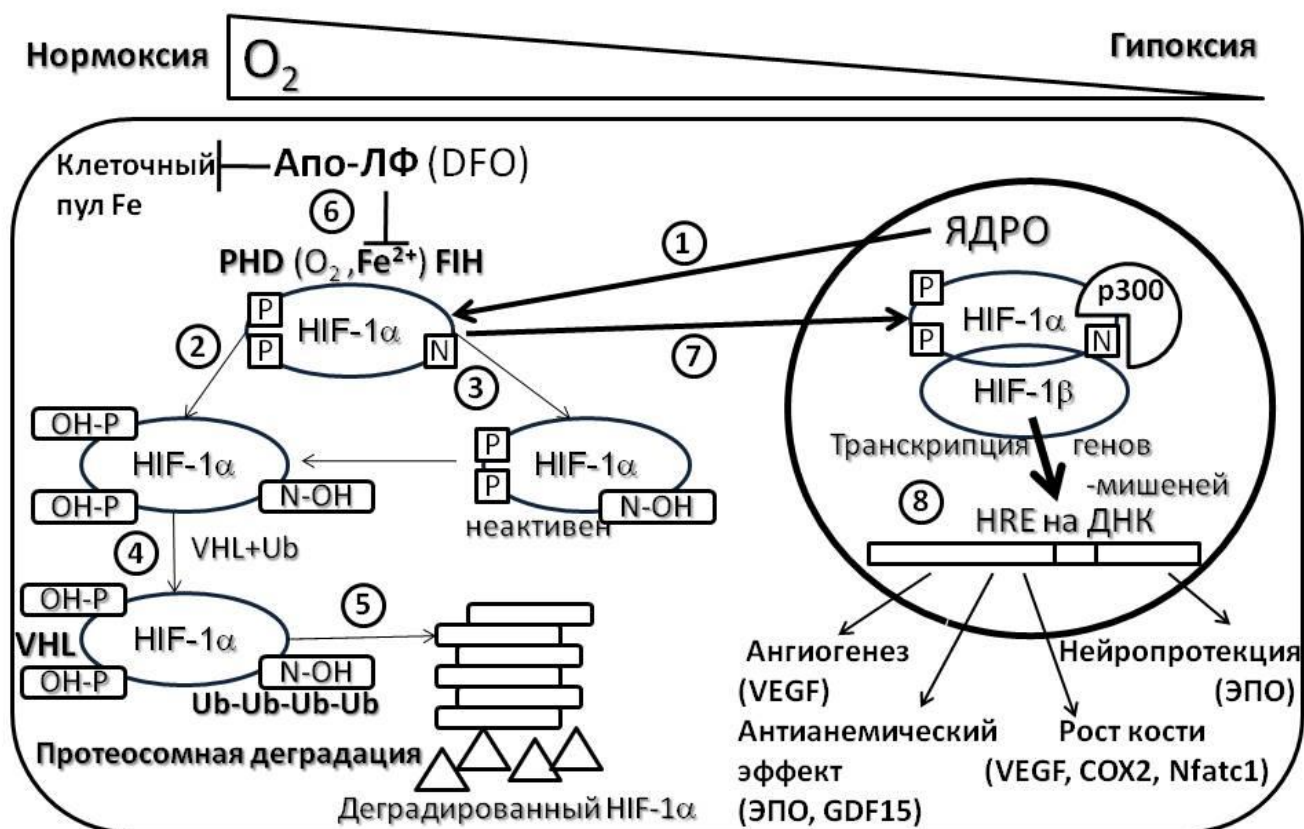


Рис. 4.1. Железо-зависимая схема регуляции HIF-сигнальной системы под действием ЛФ.

Известно, что ЛФ активирует транскрипцию таких факторов, как TGF- β 1 [Jiang 2011] и IL-1 β [Son *et al.*, 2002] (Рис. 4.2, 1), которые, в свою очередь, связываются с тирозин-киназными рецепторами и активируют синтез HIF-1 α [Hellwig-Bürigel *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2009] через MAPK-каскад [Richard *et al.*, 1999] (Рис. 4.2, 2). Более того, в ряде работ показано, что и сам по себе ЛФ активирует MAPK-каскад [Dhennin-Duthille *et al.*, 2000, Oh *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2006, Nakajima *et al.*, 2011], участие которого несомненно в Fe и O₂-независимой индукции HIF-1 α рядом ростовых факторов и цитокинов [Lee *et al.*, 2004] (Рис. 4.2, 3).

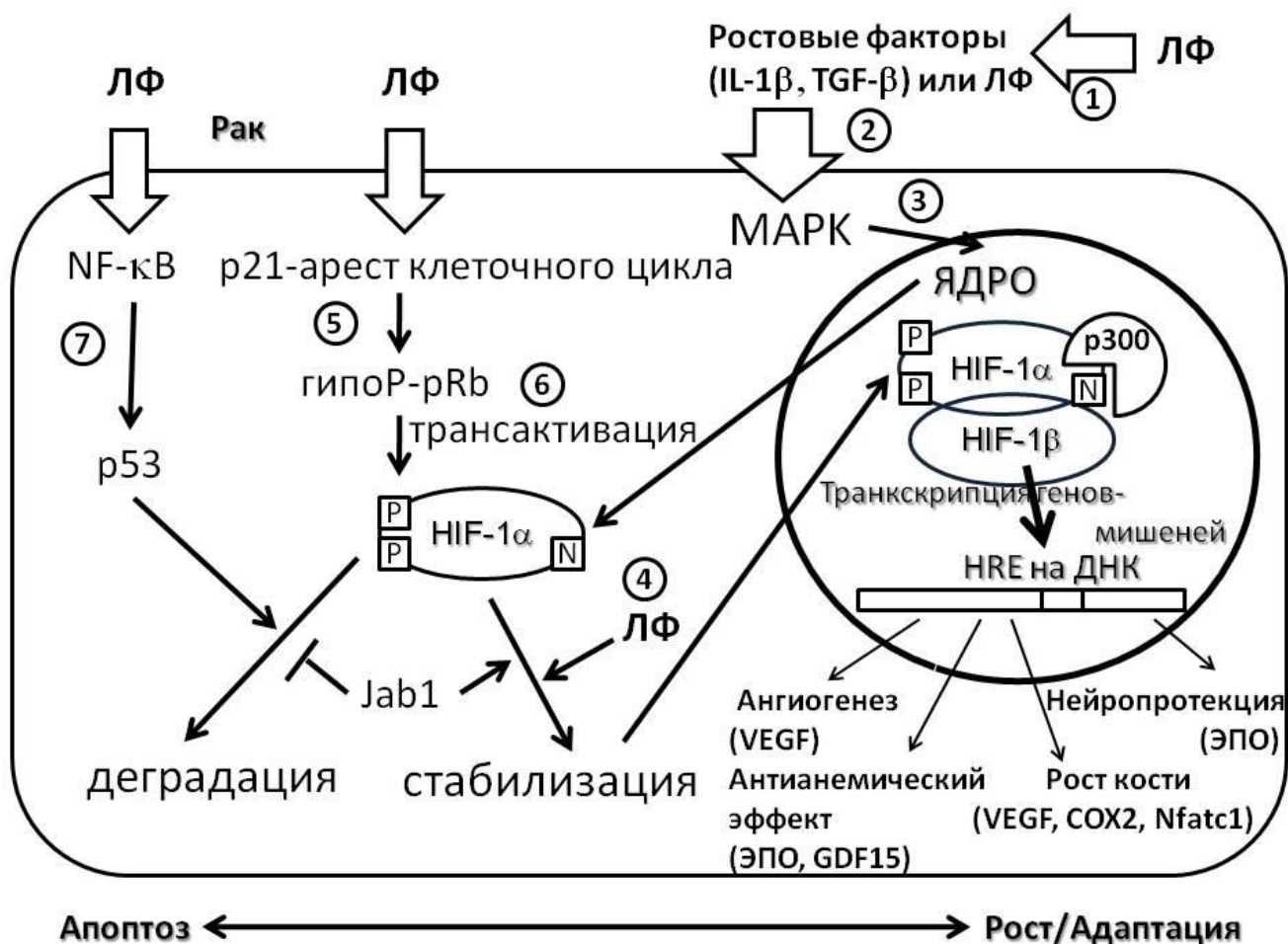


Рис. 4.2. Железо-независимая схема регуляции HIF-сигнальной системы под действием ЛФ.

Еще одним способом стабилизации HIF-1 α под действием ЛФ может быть их прямое белок-белковое взаимодействие, поскольку ЛФ является катионным белком, а участки, подвергающиеся гидроксированию в HIF-1 α (DLDLEMLAP⁵⁶⁴YIPMDDDFQL и DESGLPQLTSYDCEVN⁸⁰³APIQGSRNLLQGEEL) [Hirsila *et al.*, 2005], обогащены анионными аминокислотными остатками (Рис. 4.2, 4), и подобны полианионным пептидами в ЦП, взаимодействующим с ЛФ [White *et al.*, 2012]. Известно, что взаимодействие HIF-1 α с пресенелином 1 [De Gasperi *et al.*, 2010], гистоновой деацетилазой 7 [Kato *et al.*, 2004] и BRCA1

[Kang *et al.*, 2006] препятствует его деградации и усиливает транскрипционную активность даже в условиях нормоксии. Также показано, что ЛФ ингибирует рост карциномы (рак молочной железы) за счет ареста клеточного цикла на стадии G1, за счет ингибирования G1 циклин-зависимых киназ, увеличения уровня ингибирования p21, а также поддержания pRb в гипофосфорилированной форме [Damiens *et al.*, 1999, Son *et al.*, 2006] (Рис. 4.2, 5). Последний взаимодействует с HIF-1 α , и именно в гипофосфорилированной форме вызывает его трансактивацию [Budde *et al.*, 2005] (Рис. 4.2, 6). Действительно, арест клеточного цикла, вызываемый гипоксией, приводит к накоплению гипофосфорилированной формы pRb, а обработка клеток DFO вызывает эффект, сравнимый с острой гипоксией (0.1% кислорода), выражающийся в аресте клеточного цикла и накоплении p21 и p53 [Mizuno *et al.*, 2009]. Конкуренция между белком, связывающим Jun активационный домен (Jab1) [Bae *et al.*, 2002] и p53 за связывание с HIF-1 α определяет выбор пути клетки после стресса между адаптацией и апоптозом путем стабилизации или деградации HIF-1 α , соответственно [Larsen *et al.*, 2005]. Учитывая, что в раковых клетках нейтрофильный ЛФ активирует p53 по NF- κ B-зависимому пути [Oh *et al.*, 2004], можно предположить, что именно эта особенность ЛФ будет препятствовать возможности роста опухолей за счет ЛФ-зависимой индукции HIF-1 α (Рис. 4.2, 7).

Известно, что в мозге старых 18- и 24-месячных крыс [Ndubizu *et al.*, 2009] из-за повышенной экспрессии пролил-гидроксилаз не работает механизм стабилизации HIF-1 α , обусловленный гипоксией. Но у этих же животных агенты, инактивирующие Fe-зависимые гидроксилазы, способны запустить нечувствительный к кислороду механизм стабилизации HIF-1 α . Уменьшение стабилизации HIF-1 α в ответ на гипоксию показано и для стареющих мышей [Frenkel-Denkberg *et al.*, 1999]. Если этот феномен справедлив и для человека, то апо-ЛФ может явиться перспективным лекарством для профилактики нейродегенерации старения. Как апо-форма ЛФ [Baker, 1994], так и DFO [Armstrong *et al.*, 2001] специфически связывают ионы меди, железа и цинка. Известно, что при старении в мозге в нервной ткани накапливаются ионы железа, меди и цинка [Smith *et al.*, 2007]. Последние при болезни Альцгеймера препятствуют ферроксидазной активности предшественника β -амилоида (APP), ассоциированного с ферропортином в нервной ткани, и вызывают накопление железа в нейронах [Duce *et al.*, 2010]. Известно, что DFO и его аналоги обладают нейропротективными свойствами на животных моделях болезни Альцгеймера и Паркинсона [Ben-Shachar *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2007]. Важной особенностью ЛФ является способность проходить через гематоэнцефалический барьер [Fillebeen *et al.*, 1999; Kamemori *et al.*, 2008]. Исследования на взрослых добровольцах показали, что более половины ЛФ коровы (в апо и холо-форме) не подвергается перевариванию

в желудочно-кишечном тракте [Troost *et al.*, 2001]. Кроме того, известно, что ЛФ, прошедший кишечный тракт младенца, не лишается способности связывать ионы железа [Spik *et al.*, 1982]. По сравнению с изученными до сих пор видами млекопитающих, именно в молоке человека находят максимальное количество ЛФ (1-5 мг/мл) [Teng, 2002]. Мы показали, что вскармливание крыс и мышей молоком с добавкой апо-ЛФ человека вызывает стабилизацию HIF-1 α во всех изученных нами органах (см. Таблицу 3.1). При введении ЛФ беременным и лактирующим самкам крыс мы обнаружили индукцию синтеза ЭПО в плацентах самок и в органах потомства (рис. 3.18, 3.19), находившихся на вскармливании у самок, получавших ЛФ внутрибрюшинного либо *per os*. Возможно, что и при грудном вскармливании апо-ЛФ вызывает стабилизацию HIF-1 α и такая симуляция «гипоксического» прекондиционирования обеспечивает часть ростовых и протективных свойств ЛФ для грудных детей. С помощью Вестерн-блоттинга с антителами к ЦП мыши мы обнаружили, что введение апо-ЛФ мышам вызывало также индукцию синтеза ЦП в их мозге (Рис. 3.10). Известно, что ген ЦП является гипоксия респонсивным и его транскрипционная активация усиливается в 5-10 раз при дефиците железа [Mukhopadhyay *et al.*, 2000]. Таким образом, хелатируя железо, апо-ЛФ через HIF-1 α , вероятно, может запускать экспрессию ферроксидазы ЦП в мозге, иммунореактивность которого понижена в нейронах пациентов с болезнью Альцгеймера, при том, что нейрональное токсичное Fe (II) повышено [Castellani *et al.*, 1999]. В работе [Glezer *et al.*, 2007] обнаружены нейропротективные свойства ЦП, который отвечает за выживание нейронов при воспалении.

Неожиданным для нас оказалось, что несмотря на приложенные усилия по созданию выраженного аргироза (кормление крысят высокой дозой AgCl с рождения), выделенный из сыворотки Ag-крыс ЦП содержал 4 иона меди на молекулу, и более того, обладал пусть и сниженной в 3 раза, но характерной для ионов меди I типа голубой окраской (см. Таблицу 3.2). Расчет соотношения A_{610}/A_{280} и сопоставление содержания ионов меди и серебра в ЦП, выделенном из сыворотки Ag-крыс, позволили предположить, что замене ионами серебра подвергались два из трех ионов меди I типа, передающие электроны от окисляемых субстратов на трехъядерный центр ЦП. Действительно, лигандами для ионов меди II и III типа являются имидазольные кольца остатков гистидина, для которых не характерно образование координационных связей с ионами серебра, а среди лигандов ионов меди I типа следует отметить остатки цистеина и метионина, атомы серы которых способны образовать координационные связи с ионами серебра. Отсутствие даже следов ферроксидазной активности у ЦП, выделенного из сыворотки Ag-крыс, предполагает, что замене в первую очередь подвергается ион меди I типа в 6 домене ЦП, передающий электроны на трехъядерный медный центр от окисляемого Fe²⁺. В отличие от закисного железа, *n*-фенилендиамин окисляется с участием иона меди I типа в 4 домене ЦП. Наличие у ЦП Ag-крыс слабой *n*-фенилендиамин

оксидазной активности, вероятно, связано с тем, что в части молекул ЦП в 4 домене ион меди не заменен на ион серебра.

Полученные нами результаты показывают принципиальные отличия метаболических связей железа и меди у крыс с аргирозом и нокаутированных по гену ЦП мышей. С одной стороны, дефицит ферроксидазного ЦП привел к снижению концентрации сывороточного железа, что подтверждает его роль во встраивании железа в трансферрин (Рис. 3.12). С другой стороны, несмотря на железодефицит, развившийся у Ag-крыс до начала анемии, его усиление после кровопотери и фатальное истощение как депо железа, так и пула железа в сыворотке, Ag-крысы восстановили уровень гемоглобина с той же динамикой, что и контрольные крысы, тогда как нокаутированные по гену ЦП мыши при геморрагии не были способны восстановить уровень гемоглобина без инъекции активного ЦП [Cherukuri *et al.*, 2005]. В той же работе было продемонстрировано наличие у мышей в клетках тонкого кишечника депо ЦП, способствовавшего всасыванию пищевого железа.

Апо-ЛФ эффективнее купировал как постгеморрагическую (Рис. 3.11 и 3.12), так и гемолитическую (Рис. 3.14 и 3.15) анемию у Ag-крыс. Это согласуется с его способностью к пролонгированной стабилизации HIF-1 α , HIF-2 α у Ag-крыс (Рис. 3.16, Таблица 3.3) и выраженному увеличению концентрации ЭПО в сыворотке Ag-крыс по сравнению с контрольными (Рис. 3.17). Известно, что именно стабилизация HIF-2 α приводит к усилению эритропоэза и активации транскрипции ЭПО [Warnecke *et al.*, 2004; Scortegagna *et al.*, 2005]. Снижение концентрации железа в сыворотке после введения крысам 250 мг/кг апо-ЛФ (Рис. 3.6) согласуется с полученными ранее результатами, когда введение 15 мг апо-ЛФ на крысу примерно в 2 раза снижало концентрацию сывороточного железа в течение 2-4 часов после инъекции [van Snick *et al.* 1974]. Учитывая, что именно апо-форма ЛФ, а не насыщенный железом ЛФ и ТФ, снижала концентрацию железа в сыворотке через 1 час после внутрибрюшинного введения (Рис. 3.6), а активный ЦП, способствующий насыщению ЛФ железом [Соколов и соавт., 2005] и образующий с ним комплекс *in vivo* [Sokolov *et al.*, 2014], препятствовал пролонгированной стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α , можно предложить обобщенную схему взаимного влияния ЛФ и ЦП *in vivo* (Рис. 4.3). После внутрибрюшинного введения крысам апо-ЛФ взаимодействует с ЦП, который способствует насыщению апо-ЛФ ионами железа, насыщенный железом ЛФ быстро выводится из кровяного русла, снижает концентрацию железа в плазме крови, что приводит к снижению пула лабильного железа в клетках, снижению активности железо-зависимых гидроксилаз, стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α с последующей индукцией синтеза ЭПО и ЦП (Рис. 4.3, 1). В случае введения апо-ЛФ Ag-крысам из-за отсутствия ферроксидазной активности ЦП не происходит эффективного

насыщения ЛФ ионами железа, он проникает в клетки преимущественно в апо-форме, что приводит к более выраженному снижению пула лабильного железа в клетках, снижению активности железо-зависимых гидроксилаз, пролонгированной стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α с последующей длительной индукцией синтеза ЭПО (Рис. 4.3, 2). Тот факт, что введение активного ЦП вместе с апо-ЛФ сокращает время стабилизации HIF-1 α и HIF-2 α у Ag-крыс, свидетельствует в пользу регуляции ферроксидазной активностью ЦП защитных свойств апо-ЛФ по механизму отрицательной обратной связи.

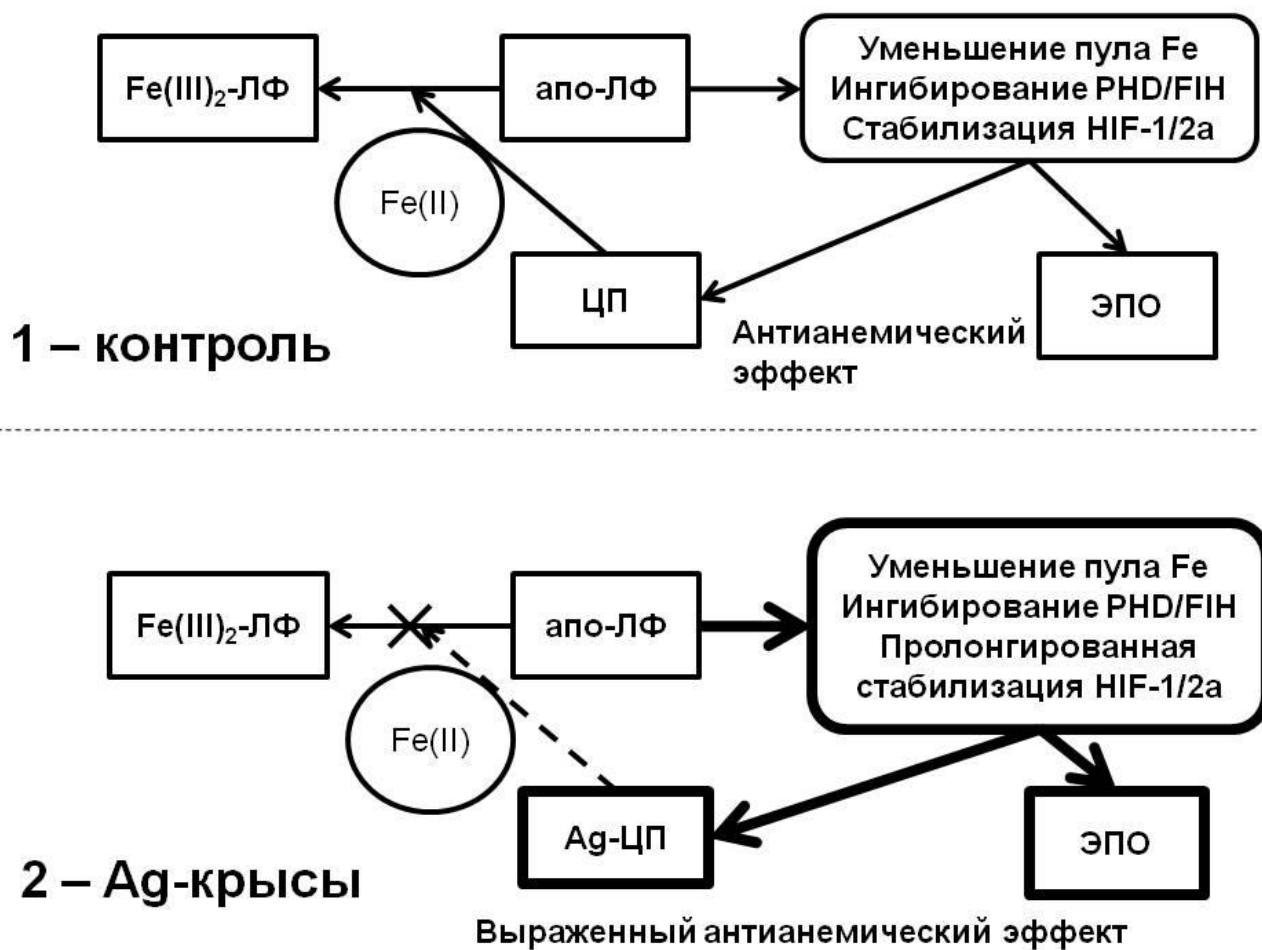


Рис. 4.3. Схема церулоплазмин(ЦП)-зависимой регуляции защитных свойств апо-ЛФ у контрольных (1) и Ag-крыс (2).

Для DFO [Dendorfer *et al.*, 2005, Salvador *et al.*, 2010] и апо-формы ТФ [Chen-Roetling *et al.*, 2011] в настоящее время обнаружены кардио- и нейропротективные свойства. Принимая во внимание большое сходство в свойствах апо-ЛФ и DFO, с учётом их способности стабилизировать HIF-1 α , следует ожидать в ближайшее время нового взгляда на терапию ЛФ кардио- и нейродегенеративных заболеваний.

5. ВЫВОДЫ

1. Апо-форма лактоферрина человека и коровы, но не насыщенный железом лактоферрин, проявляет антигипоксическую активность при введении низкоустойчивым к гипоксии мышам за сутки до тестирования в модели острой нормобарической гипоксии с гиперкапнией.
2. При экспериментальной постгеморрагической и гемолитической анемии у крыс апо-форма лактоферрина, но не насыщенный железом лактоферрин, оказывает антианемическое действие.
3. Апо-форма лактоферрина вызывает стабилизацию гипоксия-индуцибельных факторов 1-альфа и 2-альфа, увеличение синтеза эритропоэтина и церулоплазмينا в образцах тканей мышей и крыс при внутрибрюшинном, per os и интраназальном введении.
4. Дефицит ферроксидазной активности церулоплазмينا у крыс усиливает антианемическую активность апо-лактоферрина.
5. Введение апо-лактоферрина лактирующим крысам увеличивает стабильность гипоксия-индуцибельных факторов и экспрессию их генов-мишеней у потомства, однако, у беременных грызунов HIF-сигнальная система после введения апо-ЛФ активируется в плаценте, но не у эмбрионов.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ag-крысы – крысы, содержащиеся на диете с хлоридом серебра

AP-1 (activator protein-1) – транскрипционный фактор AP-1

ARD1 (arrest-defective protein 1) – каталитическая субъединица N-ацетилтрансферазы A

ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) – ядерный переносчик арилгидрокарбонового рецептора

ATF-1/CREB-1 (activating transcription factor-1/cAMP response element-binding protein-1) – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор 1

Bcl2/E1B (Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3) – проапоптотический белок семейства Bcl2

bHLH (basic helix-loop-helix) – основной спираль–петля–спираль домен

BLOTTO (bovine lacto transfer technique optimizer) – 3%-ный раствор белков молока в PBS

BLOTTO-T – BLOTTO с добавлением 0,05% (v/v) Tween 20

CCRCC (clear cell renal cell carcinoma) – светлоклеточная карцинома почки

COX – циклооксигеназа

CPH1-4 (collagen prolyl hydroxylases) – пролил-гидроксилазы коллагена 1–4

CTAD (C-terminal activation domain, CAD) – C-концевой трансактивационный домен

DEAE – диэтиламиноэтил

DFO – дефероксамин, десферал

DMT1 – транспортер двухвалентных металлов 1

DPI – дифенилен иодоний

EPAS1 – эндотелиальный PAS белок 1

Fe₂-ЛФ – насыщенный ионами железа лактоферрин

Fe₂-ТФ – насыщенный ионами железа трансферрин

FIH-1 (factor inhibiting HIF-1 α) – аспарагин-гидроксилаза HIF-1 α

FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein) – FKBP-рапамицин ассоциированный белок

GDF15 (growth differentiation factor 15) – ростовой фактор дифференцировки 15

GLUT-1 – транспортёр глюкозы 1

HAS (hypoxia ancillary sequence) – HIF-1 вспомогательная последовательность

HBS (HIF-1 binding site) – HIF-1 связывающий сайт

HDAC (Histone deacetylase) – деацетилаза гистонов

HIF (hypoxia-inducible factor) – гипоксия-индуцибельный фактор

HLF (HRF) – HIF-подобный фактор

HNF-4 (hepatic nuclear factor-4) – ядерный фактор гепатоцитов 4

HRE (hypoxia-responsive element) – гипоксия-респонсивный элемент

IARC – Международное Агентство изучения рака

IL-1 β – интерлейкин-1 β

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

IPAS (inhibitory PAS domain protein) – ингибирующий PAS-домен содержащий белок

IRE – (iron-responsive element) – железо-респонсивный элемент

IRE-BP (IRE-binding protein) – IRE-связывающий белок

IRP2 (iron regulatory protein 2) –железо-регулирующий белок 2

Jab1 (Jun activation domain-binding protein 1) – белок, связывающий Jun активирующий домен 1

K_a – константа связывания

K_d – константа диссоциации

K_m – константа Михаэлиса

LDHA – лактатдегидрогеназа A

МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы

MDM2 (mouse double minute 2 homolog) – убиквитин-протеин лигаза

МЕК – митоген-активируемые киназы киназ

MOP2 (member of PAS protein 2) – представитель PAS доменного семейства 2

МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

mRNA – информационная рибонуклеиновая кислота

Nfat1 (nuclear factor of activated T-cells) – транскрипционный фактор активированных Т-клеток

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – ядерный фактор «каппа-би»

NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерной локализации

NTAD (N-terminal activation domain, NAD) – N-концевой трансактивационный домен

o-DA – *орто*-дианизидин

ODDD (oxygen-dependent degradation domain) – домен кислород-зависимой деградации

p21 – белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A (21 кДа)

p300 – активатор транскрипции (300 кДа)

p300 – коактиватор транскрипции

p42/p44 (Erk2/Erk1) (extracellular signal-regulated kinase) – митоген-активируемые протеинкиназы 2/1 (42 кДа и 44 кДа)

p53 – опухолевый супрессор (53 кДа)

PAS – Per-ARNT-Sim домен

PBS – 150 mM NaCl, 10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4

PEST – участок белка, обогащенный а.о. пролина, глутамата, серина и треонина

PHD1-3 (prolyl hydroxylase domain proteins) – пролил-4-гидроксилазы 1-3

PI3K – фосфатидилинозитол-3 киназы

PMA – форбол-12-миристил-13-ацетат

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

p-PD – *пара*-фенилендиамина дигидрохлорид

pRb – белок ретинобластомы

PTEN (phosphatase and tensin homolog) – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3- фосфатаза

pVHL (von Hippel–Lindau tumor suppressor) – белок фон Хиппель–Линдау

Raf – серин/треонин протеин-киназа

Ras – мембраносвязанная ГТФаза

Rbx1 (RING box protein 1) – E3 убиквитин-протеин лигаза

Ref-1 (redox factor) – редокс фактор

RNA – рибонуклеиновая кислота

SDS – додецилсульфат натрия

SI-LFR – рецептор лактоферрина энтероцитов

siRNA – малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты

SOD – супероксиддисмутаза

SRC-1(steroid receptor coactivator 1) – коактиватор стероидного рецептора 1

TBS –150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl буфер, pH 7,4

TEA – триэтаноламин

TGF- β 1 – трансформирующий ростовой фактор β 1

TIF-2 (transcriptional intermediary factor 2) – промежуточный транскрипционный фактор 2

Tris – трис-(оксиметил)-аминометан

Ub – убиквитин

VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

а.о. – аминокислотный остаток

апо-ЛФ – апо-форма лактоферрина

апо-ТФ – апо-форма трансферрина

АФК – активные формы кислорода

гипоР-pRb – гипофосфорилированный белок ретинобластомы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛФ – лактоферрин

МБА – N,N'-метиленбисакриламид

ПААГ – полиакриламидный гель

ТЕМЕД – N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамин

ТФ – трансферрин

ЦП – церулоплазмин

ЧСА – альбумин сыворотки крови человека

ЭПО – эритропоэтин

ЭФ – электрофорез

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азимов, А. Краткая история химии. Развитие идей и представлений в химии / А. Азимов; пер. с англ. З.Е. Гельмана. – М.: Мир, 1983. – 187 с.
2. Влияние лактоферрина на последствия острой геморрагической анемии у крыс / М.О. Пулина, А.В. Соколов, В.А. Костевич и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2010. – Т. 148. – С. 180–184.
3. Влияние лактоферрина на ферроксидазную активность церулоплазмينا / А.В. Соколов, М.О. Пулина, Е.Т. Захарова и др. // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – С. 1231–1236.
4. Двухстадийный метод получения церулоплазмينا на основе его взаимодействия с неомицином / А.В. Соколов, В.А. Костевич, Д.Н. Романико и др. // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – С. 775–784.
5. Исследованияе рекомбинантного лактоферрина человека, секретируемого в молоко трансгенных мышей / А.В. Соколов, М.О. Пулина, А.В. Кристьян и др. // ДАН. – 2006. – Т. 411, № 2. – С. 1–3.
6. Маурер, Г. Диск-электрофорез / Г. Маурер. – М.: Мир, 1971. – С. 60–61.
7. Обнаружение и выделение комплекса церулоплазмин-лактоферрин из грудного молока / А.В. Соколов, М.О. Пулина, Е.Т. Захарова и др. // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – С. 208–215.
8. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistanse to chemotherapeutics / M. Whitnall, J. Howard, P. Ponka, D.R. Richardson // PNAS. – 2006. – V. 103. – P. 14901–14906.
9. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development / P.K. Singh, M.R. Parsek, E.P. Greenberg, M.J. Welsh // Nature. – 2002. – V. 417. – P. 552–555.
10. A dominant-negative isoform lacking exon 11 and 12 of the human hypoxic-inducible factor-1 α gene / Y.S. Chun, E.J. Choi, T.Y. Kim et al. // Biochem. J. – 2002. – V. 362. – P. 71–79.
11. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter / G. Melillo, T. Musso, A. Sica et al. // J. Exp. Med. – 1995. – V. 182. – P. 1683–1693.
12. A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses / Y.S. Chun, E.J. Choi, E.J. Yeo et al. // J. Cell Science. – 2001. – V. 114. – 4051–4061.
13. A. Dendorfer, M. Heidbreder, T. Hellwig-Bürgel et al. / Deferoxamine induces prolonged cardiac preconditioning via accumulation of oxygen radicals // Free Radic. Biol. Med. – 2005. – V. 38. – P. 117–124.
14. Aceruloplasminaemia with progressive atrophy without brain iron overload: treatment with oral chelation / F.M. Skidmore, V. Drago, P. Foster et al. / J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 2008. V. 79, № 4. – P. 467–470.

15. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism / Z.L. Harris, Y. Takahashi, H. Miyajima et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1995. – V. 92. – P. 2539–2543.
16. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor / P.J. Kallio, I. Pongratz, K. Gradin et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1997. – V. 94. – P. 5667–5672.
17. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit / C.W. Pugh, J.F. O'Rourke, M. Nagao et al. J Biol Chem. – 1997. – V. 272. – P. 11205–11214.
18. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration / C. Wan, S.R. Gilbert, Y. Wang et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – V. 105. – P. 686–691.
19. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 / J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N.V. Iyer et al. // Mol. Cell Biol. – 1996. – V. 16. – P. 4604–4613.
20. Adamson, J.W. Regulation of red blood cell production / J.W. Adamson // Am. J. Med. – 1996. – V. 101, 2A. – 4S-6S.
21. Aisen, P. Iron transport and storage proteins / P. Aisen, I. Listowsky // Annu. Rev. Biochem. – 1980. – V. 49. – P. 357–393.
22. Aisen, P. Physical biochemistry of the transferrins. In: T. Loehr (Ed.), P. Aisen, D.C. Harris, Iron carriers and iron proteins, v. 5. – New York: VCH Publishers, 1989. – P. 241–351.
23. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia / Z. Arany, L.E. Huang, R. Eckner et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1996. – V. 93, № 23. – P. 12969–12973.
24. Armstrong, C. Comparative effects of metal chelating agents on the neuronal cytotoxicity induced by copper (Cu²⁺), iron (Fe³⁺) and zinc in the hippocampus / C. Armstrong, W. Leong, G.J. Lees // Brain Res. – 2001. – V. 892. – P. 51–62.
25. Arnold, R.R. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms / R.R. Arnold, M. Brewer, J.J. Gauthier // Infection and Immunity. – 1980. – V. 28. – P. 893–898.
26. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch / D. Lando, D.J. Peet, D.A. Whelan et al. // Science. – 2002. – V. 295. – P. 858–861.
27. Bacterial lactoferrin receptors / A.B. Schryvers, R. Bannah, R.H. Yu et al. // Adv. Exp. Med. Biol. – 1998. – V. 443. – P. 123–133.
28. Baker, E.N. Structure and reactivity of transferrins / E.N. Baker // Adv. Inorg. Chem. – 1994. – V. 41. – P. 389–463.
29. Baker, E.N. Transferrins: Insights into structure and function from studies on lactoferrin / E.N. Baker, S.V. Rumball, B.F. Anderson // Trends. Biochem. Sci. – 1987. – V. 12. – P. 350–353.

30. Barton, J.C. Chelation therapy for iron overload / J.C. Barton // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2007. – V. 9. – P. 74–82.
31. Batie, C.J. Phthalate dioxygenase. / C.J. Batie, D.P. Ballou // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 188. – P. 61–70.
32. Batie, C.J. Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia* // C.J. Batie, E. LaHaie, D.P. Ballou // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262, № 4. – P. 1510–1518.
33. Baze, M.M. Gene expression of the liver in response to chronic hypoxia / M.M. Baze, K. Schlauch, Hayes, J.P. // *Physiol. Genomics.* – 2010. – V. 41. – P. 275–288.
34. Beneficial effects of desferrioxamine on encapsulated human islets - in vitro and in vivo study / V. Vaithilingam, J. Oberholzer, G.J. Guillemin, B.E. Tuch // *Am. J. Transplant.* – 2010. – V. 10. – P. 1961–1969.
35. Bennett, R.M. Lactoferrin content of peripheral blood cells / R.M. Bennett, T. Kokocinski // *Br. J. Haematol.* – 1978. – V. 39. – P. 509–521.
36. Bezwoda, W.R. Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantitation, characterization and iron binding properties / W.R. Bezwoda, N. Mansoor // *Biomed. Chromatogr.* – 1989. – V. 3. – P. 121–126.
37. Binding and Endocytosis of Bovine Hololactoferrin by the Parasite *Entamoeba histolytica* / G. Ortiz-Estrada, V. Calderón-Salinas, M. Shibayama-Salas et al. // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – P. 2015:375836.
38. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor / M. Ivan, T. Haberberger, D.C. Gervasi et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – V. 99, № 21. – P. 13459–13464.
39. Birgens, H.S. The monocytic receptor for lactoferrin and its involvement in lactoferrin-mediated iron transport / H.S. Birgens // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1994. – V. 357. – P. 99–109.
40. Bovine milk lactoferrin induces synthesis of the angiogenic factors VEGF and FGF2 in osteoblasts via the p44/p42 MAP kinase pathway / K.I. Nakajima, Y. Kanno, M. Nakamura et al. // *Biometals.* – 2011. – V. 24, № 5. – P. 847–856.
41. Brahmachari, H.D. Cobalt compounds for the control of hypoxic stress / H.D. Brahmachari, S. Joseph // *Aerosp. Med.* – 1973. – V. 44, № 6. – P. 636–638.
42. BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1 α stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression / H.J. Kang, H.J. Kim, J.K. Rih et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 13047–13056.

43. Breast milk lactoferrin regulates gene expression by binding bacterial DNA CpG motifs but not genomic DNA promoters in model intestinal cells / P. Mulligan, N.R. White, G. Monteleone et al. // *Pediatr. Res.* – 2006. – V. 59. – P. 656–661.
44. Brock, J.H. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant / J.H. Brock // *Arch. Dis. Child.* – 1980. – V. 55. – P. 417–421.
45. Brock, J.H. The physiology of lactoferrin / J.H. Brock // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80. – P. 1–6.
46. Bruick, R.K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia / R.K. Bruick // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. – V. 97. – P. 9082–9087.
47. Bunn, H.F. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia / H.F. Bunn, R.O. Poyton // *Physiol. Rev.* – 1996. – V. 76 – P. 839–885.
48. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial / H. Tsuda, T. Kozu, G. Iinuma et al. // *Biometals.* – 2010. – V. 23. – P. 399–409.
49. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism / K. Salnikow, W. Su, M.V. Blagosklonny, Costa M. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 3375–3378.
50. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress / K. Salnikow, M.V. Blagosklonny, H. Ryan et al. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 38–41.
51. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases / P. Koivunen, M. Hirsilä, V. Günzler et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 9899–9904.
52. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha / N.V. Iyer, L.E. Kotch, F. Agani et al. // *Genes Dev.* – 1998. – V. 12, № 2. – P. 149–162.
53. Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants / G. Spik, B. Brunet, C. Mazurier-Dehaine et al. // *Acta Paediatr. Scand.* – 1982. – V. 71. – P. 979–985.
54. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice / J.H. Nuijens, P.H. van Berkel, M.E. Geerts et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, № 13. – P. 8802–8807.
55. Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle / A.D. Eckhart, N. Yang, X. Xin, J.E. Faber // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – V. 94. – P. 9487–9492.
56. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor / M. Hirsilä, P. Koivunen, V. Günzler et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 33. – P. 30772–30780.

57. Chen-Roetling, J. Apotransferrin protects cortical neurons from hemoglobin toxicity / J. Chen-Roetling, L. Chen, R.F. Regan // *Neuropharmacology*. – 2011. – V. 60. – P. 423–431.
58. Chun, Y.S. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α / Y.S. Chun, M.S. Kim, J.W. Park // *J. Korean Med. Sci.* – 2002. – V. 17. – P. 581–588.
59. Clinically available iron chelators induce neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease after peripheral administration / D.T. Dexter, S.A. Statton, C. Whitmore // *J. Neural. Transm.* – 2011. – V. 118. – P. 223–231.
60. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter / H. Gunshin, B. Mackenzie, U.V. Berger et al. // *Nature*. – 1997. – V. 388. – P. 482–488.
61. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α / Y. Yuan, G. Hilliard, T. Ferguson, D.E. Millhorn // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 18. – P. 15911–15916.
62. Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1 α , HIF-2 α , and other pathways / G.P. Elvidge, L. Glenny, R.J. Appelhoff et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 15215–15226.
63. Cormier-Regard, S. Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes / S. Cormier-Regard, S.V. Nguyen, W.C. Claycomb // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 17787–17792.
64. Crosa, J.H. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria / J.H. Crosa // *Microbiol. Rev.* – 1989. – V. 53. – P. 517–530.
65. Crystallographic and spectroscopic characterization of a nonheme Fe(IV)-O complex / J.U. Rohde, J.H. In, M.H. Lim et al. // *Science*. – 2003. – V. 299. – P. 1037–1039.
66. Cuatrecasas, P. Selective enzyme purification by affinity chromatography / P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1968. – V. 61. – P. 636–643.
67. Current approach to hemochromatosis / P. Brissot, M.B. Troadec, E. Bardou-Jacquet et al. // *Blood Rev.* – 2008. – V. 22, № 4. – P. 195–210.
68. Dang, C.V. Oncogenic alterations of metabolism / C.V. Dang, G.L. Semenza // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – V. 24. – P. 68–72.
69. Davies, P. Alpha-synuclein is a cellular ferrireductase / P. Davies, D. Moualla, D.R. Brown // *PLoS One*. – 2011. – 6:e15814.
70. Davis, B.J. Disk Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins / B.J. Davis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1964. – V. 121. – P. 404–427.
71. De Domenico, I. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation / I. De Domenico, D.M. Ward, J. Kaplan. – 2009. – *Blood*. – V. 114. – P. 4546–4551.

72. De Vet, B.J. Lactoferrin and iron absorption in the small intestine / B.J. de Vet, J. V. van Gool // *Acta Med. Scand.* – 1974. – V. 196. – P. 393–402.
73. Desferal inhibits breast tumor growth and does not interfere with the tumoricidal activity of doxorubicin / E.M. Hoke, C.A. Maylock, E. Shacter. – 2005. – *Free Radic. Biol. Med.* – V. 39. – P. 403–411.
74. Differential effects of black versus green tea on risk of Parkinson's disease in the Singapore Chinese Health Study / L.C. Tan, W.P. Koh, J.M. Yuan et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2008. – V. 167. – P. 553–560.
75. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia / H.-P. Gerber, F. Condorelli, J. Park, N. Ferrara // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 23659–23667.
76. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells / C. Warnecke, Z. Zaborowska, J. Kurreck et al. – 2004. – *FASEB J.* – V. 18. – P. 1462–1464.
77. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy / T. Hofer, I. Desbaillets, G. Hopfl et al. // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 2715–2717.
78. Divalent metal inhibition of non-haem iron uptake across the rat duodenal brush border membrane / M.W. Smith, K.B. Shenoy, E.S. Debnam et al. // *Br. J. Nutr.* – 2002. – V. 88. – P. 51–56.
79. Doll, R. Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers / R. Doll, L.G. Morgan, F.E. Speizer // *Br. J. Cancer.* – 1970. – V. 24, № 4. – P. 623–632.
80. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism / J. Chen, S. Zhao, K. Nakada et al. // *Am. J. Pathol.* – 2003. – 162, № 4. – P. 1283–1291.
81. Dose-response and time-response study of erythrocytosis in rats after intrarenal injection of nickel subsulfide / E.E. Morse, T.Y. Lee, R.F. Reiss, F.W. Jr. Sunderman // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 1977. – V. 7, № 1. – P. 17–24.
82. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway / M. Hirsilä, P. Koivunen, L. Xu et al. // *FASEB J.* – 2005. – V. 19. – P. 1308–1310.
83. Effect of desferrioxamine on serum erythropoietin and ventilator sensitivity to hypoxia in humans / X. Ren, Dorrington K.L., P.H. Maxwell, P.A. Robbins // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – V. 89. – P. 680–686.
84. Effect of lactoferrin on oxidative features of ceruloplasmin / A.V. Sokolov, K.V. Ageeva, M.O. Pulina et al. // *BioMetals.* – 2009. – V. 22. – P. 521–529.

85. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial / T. Kozu, G. Iinuma, Y. Ohashi et al. // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. – 2009. – V. 2. – P. 975–983.
86. Effectiveness of oral iron chelator treatment with deferasirox in an aceruloplasminemia patient with a novel ceruloplasmin gene mutation / Y. Suzuki, K. Yoshida, Y. Aburakawa et al. // *Intern. Med.* – 2013. – V. 52, № 13. – P. 1527–1530.
87. Effects of bovine lactoferrin on the immature porcine intestine / D. N. Nguyen, Y. Li, P.T. Sangild et al. // *Br. J. Nutr.* – 2014. – V. 111. – P. 321–331.
88. Effects of iron-unsaturated human lactoferrin on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells / H. Shoji, S. Oguchi, K. Shinohara et al. // *Pediatr. Res.* – 2007. – V. 61. – P. 89–92.
89. Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin – further evidence for its role in the transport of copper / M.M. Shavlovski, N.A. Chebotar, L.A. Konopistseva et al. // *Biometals*. – 1995. – V. 8. – P. 122–128.
90. Engelmayer, J. Talactoferrin stimulates wound healing with modulation of inflammation / J. Engelmayer, P. Blezinger, A. Varadhachary // *J. Surg. Res.* – 2008. – V. 149. – P. 278–286.
91. Enhanced autophagy from chronic toxicity of iron and mutant A53T alpha-synuclein: implications for neuronal cell death in Parkinson disease / K.C. Chew, E.T. Ang, Y.K. Tai et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 286. – P. 33380–33389.
92. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys / C. Rosenberger, S. Mandriota, J.S. Jurgensen et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2002. – V. 13. – P. 1974–1976.
93. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma / F.Q. An, M. Matsuda, H. Fujii, Y. Matsumoto // *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* – 2000. – V. 126. – P. 153–160.
94. Fe(II)-induced DNA damage in alpha-synuclein-transfected human dopaminergic BE(2)-M17 neuroblastoma cells: detection by the comet assay / F.L. Martin, S.J. Williamson, K.E. Paleologou et al. // *J. Neurochem.* – 2003. – V. 87. – P. 620–630.
95. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor / D. Lando, D.J. Peet, J.J. Gorman et al. // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – P. 1466–1471.
96. Fling, S.P. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea / S.P. Fling, D.S. Gregerson // *Anal. Biochem.* – 1986. – V. 155. – P. 83–88.

97. Fransson, G.B. Iron in human milk / G.B. Fransson, B. Lonnerdal // *J. Pediatr.* – 1980. – V. 96. – P. 380–384.
98. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress / H.F. Poon, V. Calabrese, G. Scapagnini, D.A. Butterfield // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2004. – V. 59, № 5. – P. 478–493.
99. Frenkel-Denkberg, G. The function of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is impaired in senescent mice / G. Frenkel-Denkberg, D. Gershon, A.P. Levy // 1999. – *FEBS Lett.* – V. 462. – P. 341–344.
100. Frieden, E. Ceruloplasmin: the cooper transport protein with essential oxidase activity / E. Frieden, S. Hsieh // *Adv. Enzymol.* – 1976. – V. 44. – P. 187–236.
101. Friedlich, A.L. The 5'-untranslated region of Parkinson's disease alpha-synuclein messenger RNA contains a predicted iron responsive element / A.L. Friedlich, R.E. Tanzi, J.T. Rogers // *Mol. Psychiatry.* – 2007. – V. 12. – P. 222–223.
102. Fukuda, R. Insulin like growth factor 1 induces HIF-1-mediated VEGF expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer cells / R. Fukuda // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, № 41. – P. 38205–38211.
103. G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza / Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1995. – V. 92. – P. 5510–5514.
104. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults / F.J. Troost, J. Steijns, W.H. Saris, R.J. Brummer // *J. Nutr.* – 2001. – V. 131. – P. 2101–2104.
105. Gene expression profiling of hypoxia signaling in human hepatocellular carcinoma cells / A. Vengellur, J.M. Phillips, J.B. Hogenesch, J.J. LaPres // *Physiol. Genomics.* – 2005. – V. 22. – P. 308–318.
106. Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor / J. Grzenkowicz-Wydra, J. Cisowski, J. Nakonieczna et al. // *Mol. Cell Biochem.* – 2004. – V. 264. – P. 169–181.
107. Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation / I. Glezer, A. Chernomoretz, S. David et al. // *PLoS One.* – 2007. – V. 2. – e310.
108. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease / D. Kaur, F. Yantiri, S. Rajagopalan et al. // *Neuron.* – 2003. – V. 37. – P. 899–909.
109. Giaccia, A.J. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals / A.J. Giaccia, M.B. Kastan // *Genes Dev.* – 1998. – V. 12. – P. 2973–2983.

110. Gifford, J.L. Structural characterization of the interaction of human lactoferrin with calmodulin / J.L. Gifford, H. Ishida, H.J. Vogel // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – e51026.
111. Giordano, F.J. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch / F.J. Giordano, R.S. Johnson // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2001. – V. 11 – P. 35–40.
112. Gleadle, J.M. Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing / J.M. Gleadle, B.L. Ebert, P.J. Ratcliffe // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 234. – P. 92–99.
113. Gleadle, J.M. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Src kinase / J.M. Gleadle, P.J. Ratcliffe // *Blood*. – 1997. – V. 89. – P. 503–509.
114. Goldberg, M.A. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein / M.A. Goldberg, S.P. Dunning, H.F. Bunn // *Science*. – 1988. – V. 242 – P. 1412-1415.
115. Green tea consumption and cognitive function: across-sectional study from the Tsurugaya Project 1 / S. Kuriyama, A. Hozawa, K. Ohmori et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2006. – V. 83. – P. 355–361.
116. Groves, M.L. The isolation of a red protein from milk / M.L. Groves // *J. Am. Chem. Soc.* – 1960. – V. 82. – P. 3345–3350.
117. Gu, J. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine / J. Gu, J. Milligan, L.E. Huang // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 3550–3554.
118. Hanson, E.S. Oxygen and iron regulation of iron regulatory protein 2 / E.S. Hanson, M.L. Rawlins, E.A. Leibold // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 40337–40342.
119. Harris, A.L. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth / A.L. Harris // *Nat. Rev. Cancer*. – 2002. – V. 2. – P. 38–47.
120. Hayaishi, O. Nature and mechanisms of oxygenases / O. Hayaishi, M. Nozaki // *Science*. – 1969. – V. 164. – P. 389–396.
121. He, J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding lactoferrin to DNA / J. He, P. Furmanksi // *Nature*. – 1995. – V. 373. – P. 721–724.
122. Heme-Containing Oxygenases / M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, J.H. Dawson // *Chem. Rev.* – 1996. – V. 96, № 7. – P. 2841–2888.
123. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia / E. Berra, E. Benizri, A. Ginouvès et al. // *EMBO J.* – 2003. – V. 22, № 16. – P. 4082–4090.
124. HIF-1 α dysfunction in diabetes / H. Thangarajah, I.N. Vial, R.H. Grogan et al. // *Cell Cycle*. – 2010. – V. 9. – P. 75–79.

125. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors / H.M. Sowter, P.J. Ratcliffe, P. Watson et al. // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 6669–6673.
126. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner / M. Scortegagna, K. Ding, Q. Zhang et al. // *Blood.* – 2005. – V. 105. – P. 3133–3140.
127. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing / M. Ivan, K. Kondo, H. Yang et al. // *Science.* – 2001. – V. 292. – P. 464–468.
128. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin / T. Tanno, N.V. Bhanu, P.A. Oneal et al. // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – P. 1096–1101.
129. Hodgson, G.S. Properties of haemopoietic stem cells in phenylhydrazine treated mice / G.S. Hodgson // *Cell Tissue Kinet.* – 1973. – V. 6. – P. 199–208.
130. Hoke, E.M. Desferal inhibits breast tumor growth and does not interfere with the tumoricidal activity of doxorubicin / E.M. Hoke, C.A. Maylock, E. Shacter / *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – V. 39. – P. 403–411.
131. Human lactoferrin activates transcription of IL-1beta gene in mammalian cells / K.-N. Son, J. Park, C.-K. Chung et al. // *Biochem. Biophys. Res. Communic.* – 2002. – V. 290. – P. 236–241.
132. Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Flk-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration / C.W. Kim, K.N. Son, S.Y. Choi, J. Kim // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580. – P. 4332–4336.
133. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins / M.-H. Metz-Boutigue, J. Jolles, J. Mazurier et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – V. 145. – P. 659–676.
134. Human nasal glandular secretion of novel antioxidant activity: cholinergic control / D.B. Peden, M.E. Brown, Y. Wade et al. // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1991. – V. 143. – P. 545–552.
135. Human neutrophil lactoferrin trans-activates the matrix metalloproteinase 1 gene through stress-activated MAPK signaling modules / S.M. Oh, D.H. Hahm, I.H. Kim, S.Y. Choi // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 42575–42579.
136. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1 / L.A. Palmer, G.L. Semenza, M.H. Stoler, R.A. Johns // *Am. J. Physiol.* – 1998. – V. 274. – P. 212–219.
137. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells / A. Namiki, E. Brogi, M. Kearney et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270, № 52. – P. 31189–31195.
138. Hypoxia rapidly activates HIF-3α mRNA expression / M. Heidbreder, F. Frohlich, O. Jöhren et al. // *FASEB J.* – 2003. – V. 17 – P. 1541–1543.

139. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand / J. Hu, D.J. Discher, N.H. Bishopric, K.A. Webster // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – V. 245. – P. 894–799.
140. Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways / S. Mizuno, H.J. Bogaard, N.F. Voelkel et al. – *Respir. Res.* – 2009. – V. 10. – P. 17.
141. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza, B.H. Jiang, S.W. Leung et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 32529–32537.
142. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1 / G. Zhou, L.A. Dada, M. Wu et al. // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2009. – V. 297. – P. 1120–1130.
143. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases / C.C. Wykoff, N.J. Beasley, P.H. Watson et al. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 7075–7083.
144. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family / K.S. Hewitson, L.A. McNeill, M.V. Riordan et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277, № 29. – P. 26351–26355.
145. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions / J.W. Lee, S.H. Bae, J.W. Jeong et al. // *Exp. Mol. Med.* – 2004. – V. 36. – P. 1–12.
146. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension / B.H. Jiang, G.L. Semenza, C. Bauer, H.H. Marti // *Am. J. Physiol.* – 1996. – V. 271, № 4. – P. 1172–1180.
147. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803 / L.A. McNeill, K.S. Hewitson, T.D. Claridge et al. // *Biochem. J.* – 2002. – V. 367, Pt. 3. – P. 571–575.
148. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 has a high affinity for ferrous iron and 2-oxoglutarate / L.A. McNeill, E. Flashman, M.R.G. Buck et al. // *Mol. Bio. Syst.* – 2005. – V. 1. – P. 321–324.
149. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3) / I. Caniggia, H. Mostachfi, J. Winter et al. // *J. Clin. Invest.* – 2000. – V. 105. – P. 577–587.
150. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth / P.H. Maxwell, G.U. Dachs, J.M. Gleadle et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – V. 94, № 15. – P. 8104–8109.

151. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia / P.J. Lee, B.H. Jiang, B.Y. Chin et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 5375–5381.
152. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species / C. Schroedl, D.S. McClintock, G.R. Budinger, N.S. Chandel // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2002. – V. 283. – P. 922–931.
153. Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme / L. Kukkola, R. Hieta, K.I. Kivirikko, J. Myllyharju // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 47685–47693.
154. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha / E. Gothie, D.E. Richard, E. Berra et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 6922–6927.
155. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter / S. Lu, X. Gu, S. Hoestje, D.E. Epner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – V. 1574, № 2. – P. 152–156.
156. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide / H. Kimura, A. Weisz, T. Ogura et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 2292–2298.
157. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1 / J.F. O'Rourke, C.W. Pugh, S.M. Bartlett, P.J. Ratcliffe // *Eur. J. Biochem.* – 1996. – V. 241. – P. 403–410.
158. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation / N. Masson, C. Willam, P.H. Maxwell et al. // *EMBO J.* – 2001. – V. 20, № 18. – P. 5197–5206.
159. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha / M.S. Wiesener, H. Turley, W.E. Allen et al. // *Blood.* – 1998. – V. 92, № 7. – P. 2260–2268.
160. Induction of Hif-1alpha in response to hypoxia is instantaneous / U.R. Jewell, I. Kveitkova, A. Scheid et al. // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 1312–1314.
161. Induction of hypoxia inducible factor (HIF-1 α) in rat kidneys by iron chelation with the hydroxypyridinone, CP94 / J.H. Baek, C.E. Reiter, D.J. Manalo et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1809. – P. 262–268.
162. Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants / L. Davidsson, P. Kastenmayer, M. Yuen et al. // *Pediatr. Res.* – 1994. – V. 35. – P. 117–124.

163. Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline / O. Cirioni, A. Giacometti, F. Barchiesi, G. Scalise // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2000. – V. 46. – P. 577–582.
164. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein / K. Kondo, J. Klco, E. Nakamura et al. // *Cancer Cell.* – 2002. – V. 1, № 3. – P. 237–246.
165. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: Possible links between cell metabolism and stabilization of HIF / P. Koivunen, M. Hirsilä, A.M. Remes et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 4524–4532.
166. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression / Y. Makino, R. Cao, K. Svensson et al. // *Nature.* – 2001. – V. 414. – P. 550–554.
167. Interaction of alpha-synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement / A. Binolfi, R.M. Rasia, C.W. Bertoncini et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – P. 9893–9901.
168. Interaction of lactoferrin with ceruloplasmin / E.T. Zakharova, M.M. Shavlovski, M.G. Bass et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – V. 374. – P. 222–228.
169. Interactions between HIF-1 and Jab1: balancing apoptosis and adaptation. Outline of a working hypothesis / M. Larsen, A. Høg, E.L. Lund, P.E. Kristjansen // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2005. – V. 566. – P. 203–211.
170. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 / T. Hellwig-Bürgel, K. Rutkowski, E. Metzen et al. // *Blood.* – 1999. – V. 94. – P. 1561–1567.
171. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing / E. Metzen, U. Berchner-Pfannschmidt, P. Stengel et al. // *J. Cell Sci.* – 2003. – V. 116. – P. 1319–1326.
172. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis / E.C. Hirsch, J.P. Brandel, P. Galle et al. // *J. Neurochem.* – 1991. – V. 56. – P. 446–451.
173. Iron chelator-mediated alterations in gene expression: identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 alpha and p53 / F. Saletta, Y.S. Rahmanto, E. Noulis, D.R. Richardson // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – V. 77. – P. 443–458.
174. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease / J.A. Duce, A. Tsatsanis, M.A. Cater et al. // *Cell.* – 2010. – V. 142. – P. 857–867.

175. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency / M. Sanchez, B. Galy, M.U. Muckenthaler, M.W. Hentze // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – V. 14. – P. 420–426.
176. Is increased redox-active iron in Alzheimer disease a failure of the copper-binding protein ceruloplasmin? / R.J. Castellani, M.A. Smith, A. Nunomura et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 26. – P. 1508–1512.
177. Iyer, S. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism / S. Iyer, B. Lonnerdal // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 1993. – V. 47. – P. 232–241.
- J. Cornish, K.E. Callon, D. Naot // *Endocrinology.* – 2004. – V. 145. – P. 4366–4374.
178. Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability / M.K. Bae, M.Y. Ahn, J.W. Jeong et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 9–12.
179. Jasmin, G. Polycythemia induced in rats by intrarenal injection of nickel sulfide Ni₃S₂ / G. Jasmin, B. Solymoss // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1975. – V. 148, №3. – P. 774–776.
180. Jiang, R. Apo-lactoferrin regulates transcription of the TGF beta 1 gene and may thus stimulate intestinal differentiation / R. Jiang, B. Lonnerdal // *FASEB J.* – 2011. – V. 25. – P. 340–346.
181. Johanson, B. Isolation of an iron containing red protein from human milk / B. Johanson // *Acta Chem. Scand.* – 1960. – V. 14. – P. 510–512.
182. Kaelin, W.G. Jr. The VHL tumour-suppressor gene paradigm / W.G. Jr. Kaelin, E.R. Maher // *Trends Genet.* – 1998. – V. 14, № 10. – P. 423–426.
183. Kasprzak, K.S. Nickel carcinogenesis / K.S. Kasprzak, F.W. Jr. Sunderman, K. Salnikow // *Mutat. Res.* – 2003. – V. 533. – P. 67–97.
184. Kato, H. Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity / H. Kato, S. Tamamizu-Kato, F. Shibasaki. – *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 41966–41974.
185. Keberle, H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism / H. Keberle // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1964. – V. 119. – P. 758–775.
186. Kietzmann, T. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes / T. Kietzmann, U. Roth, K. Jungermann. – *Blood.* – 1999. – V. 94. – P. 4177–4185.
187. Lactoferrin ameliorates symptoms of experimental encephalomyelitis in Lewis rats / M. Zimecki, M. Kocieba, G. Chodaczek et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2007. – V. 182. – P. 160–166.
188. Lactoferrin and iron absorption in newborn infants / S.J. Fairweather-Tait, S.E. Balmer, P.H. Scott, M.J. Minski // *Pediatr. Res.* – 1987. – V. 22. – P. 651–654.

189. Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases / A. Frioni, M.P. Conte, A. Cutone et al. // *Biometals*. – 2014. – V. 27, № 5. – P. 843–856.
190. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron disorders in pregnant and non-pregnant women / R. Paesano, F. Berlutti, M. Pietropaoli et al. // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2010. – V. 23. – P. 577–587.
191. Lactoferrin from bovine colostrum regulates prolyl hydroxylase 2 activity and prevents prion protein-mediated neuronal cell damage via cellular prion protein / Park Y.G., Moon J.H., Park S.Y. // *Neuroscience*. – 2014. – V. 274. – P. 187–197.
192. Lactoferrin in rabbit bile: its relation to iron metabolism / H. Van Vugt, J. Van Gool, N.C. Ladiges, W. Boers // *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* – 1975. – V. 60. – P. 79–88.
193. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells / E. Damiens, I. El Yazidi, J. Mazurier et al. // *J. Cell. Biochem.* – 1999. – V. 74. – P. 486–498.
194. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo /
195. Lactoferrin prevents LPS-induced decrease of the iron exporter ferroportin in human monocytes/macrophages / A. Cutone, A. Frioni, F. Berlutti et al. // *Biometals*. – 2014. – V. 27, № 5. – P. 807–813.
196. Lactoferrin receptors in gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process / A. Ekins, A.G. Khan, S.R. Shouldice, A.B. Schryvers // *Biometals*. – 2004. – V. 17. – P. 235–243.
197. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line / I. Dhennin-Duthille, M. Masson, E. Damiens et al. // *J. Cell. Biochem.* – 2000. – V. 79. – P. 583–593.
198. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes / A.V. Sokolov, E.T. Zakharova, V.A. Kostevich et al. // *Biometals*. – 2014. – V. 27. – P. 815–828.
199. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophag / U.K. Laemmli // *Nature (London)*. – 1970. – V. 227. – P. 680–686.
200. Lan, J. Excessive iron accumulation in the brain: a possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease / J. Lan, D.H. Jiang // *J. Neural Transm.* – 1997 – V. 104. – P. 649–660.
201. Laurell, C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in antibody-containing agarose gel. In: H. Peeters (Ed.), *Protides of the biological fluids*. – Amsterdam: Elsevier, 1967. – P. 499–502.

202. Lee, J.W. Iron chelation therapy in the myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: a review of experience in South Korea / J.W. Lee // *Int. J. Hematol.* – 2008. – V. 88. – P. 16–23.
203. Li, L. Iron chelation inhibits NF-kappaB-mediated adhesion molecule expression by inhibiting p22(phox) protein expression and NADPH oxidase activity / L. Li, B. Frei // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – V. 26. – P. 2638–2643.
204. Lok, C.N. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene / C.N. Lok, P. Ponka // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 24147–24152.
205. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression / W. Zundel, C. Schindler, D. Haas-Kogan et al. // *Genes Dev.* – 2000. – V. 14. – P. 391–396.
206. Maaks, S. Development and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in pediatric medicine / S. Maaks, H.Z. Yan, W.G. Wood // *J. Biolumines. Chemilumines.* – 1989. – V. 3. – P. 221–226.
207. Mahon, P.C. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity / P.C. Mahon, K. Hirota, G.L. Semenza // *Genes Dev.* – 2001. – V. 15. – P. 2675–2686.
208. Management of transfusion-related iron overload in patients with myelodysplastic syndromes / J. Shah, S.E. Kurtin, L. Arnold et al. // *Clin. J. Oncol. Nurs.* – 2012. – V. 16. – P. 37–46.
209. Mannaerts, G.P. Metabolic pathways in mammalian peroxisomes / G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven // *Biochimie.* – 1993. – V. 75. – P. 147–158.
210. Masson, P.L. La Lactoferrine. Proteine des Secretions Externes et des Leucocytes Neutrophiles / P.L. Masson. – Bruxelles: Editions Arscia, 1970. – 232 p.
211. Maxwell, P.H. Activation of the HIF pathway in cancer / P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2001. – V. 11, № 3. – P. 293–299.
212. Maxwell, P.H. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism / P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – V. 90, № 6. – P. 2423–2427.
213. Maxwell, P.H. The erythropoietin-producing cells / P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe // *Exp. Nephrol.* – 1996. – V. 4, № 6. – P. 309–313.
214. Mazurek, S. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy / S. Mazurek, C.B. Boschek, E.J. Eigenbrodt // *Bioenerg. Biomembr.* – 1997. – V. 29. – P. 315–330.
215. Mechanism of regulation of the hypoxia inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein / K. Tanimoto, Y. Makino, T. Pereira, L. Poellinger // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – P. 4298–4309.

216. Mitchell, P. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria / P. Mitchell, J. Moyle // *Nature*. – 1965. – V. 208. – P. 147–151.
217. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription / N.S. Chandel, E. Maltepe, E. Goldwasser et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – V. 95. – P. 11715–11720.
218. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project / A. Piperno, S. Galimberti, R. Mariani et al. // *Blood*. – 2011. – V. 117. – P. 2953–2959.
219. Modulation of hypoxia inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol-3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics / H. Zhong, K. Chiles, D. Feldser et al. // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – P. 1541–1545.
220. Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in osteoblasts / D. Naot, A. Chhana, B.G. Matthews et al. // *Bone*. – 2011. – V. 49. – P. 217–224.
221. Montreuil, J. Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk / J. Montreuil, J. Tonnelat, S. Mullet // *Biochim. Biophys. Acta*. – V. 196045. – P. 413–421.
222. Mukhopadhyay, C.K. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency / C.K. Mukhopadhyay, B. Mazumder, P.L. Fox // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 21048–21054.
223. Multiple splice variants of the human HIF-3alpha locus are targets of the VHL E3 ubiquitin ligase complex / M.A. Maynard, H. Qi, J. Chung et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 11032–11040.
224. Myllyharju, J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets / J. Myllyharju // *Ann. Med.* – 2008. – V. 40. – P. 402–417.
225. Ndubuizu, O.I. Increased prolyl 4-hydroxylase expression and differential regulation of hypoxia-inducible factors in the aged rat brain / O.I. Ndubuizu, J.C. Chavez, J.C. LaManna // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2009. – V. 297. – P. 158–165.
226. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus GG* / M.P. Sherman, S.H. Bennett, F.F. Hwang, C. Yu // *Biometals*. – 2004. – V. 17. – P. 285–289.
227. Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 alpha and induction of autophagy in SH-SY5Y cells / Y. Wu, X. Li, W. Xie et al. // *Neurochem. Int.* – 2010. – V. 57, № 3. – P. 198–205.

228. Neuroprotective actions of deferiprone in cultured cortical neurones and SHSY-5Y cells / F. Molina-Holgado, A. Gaeta, P.T. Francis et al. // *J. Neurochem.* – 2008. – V. 105. – P. 2466–2476.
229. Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF-kappaB activation cascade / S.M. Oh, C.W. Pyo, Y. Kim, S.Y. Choi // *Oncogene.* – 2004. – V. 23. – P. 8282–8291.
230. Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors / K. Salnikow, W.G. An, G. Melillo et al. // *Carcinogenesis.* – 1999. – V. 20, № 9. – P. 1819–1823.
231. Norrby, K. Human apo-lactoferrin enhances angiogenesis mediated by vascular endothelial growth factor A in vivo / K. Norrby // *J. Vasc. Res.* – 2004. – V. 41. – P. 293–304.
232. Norris, M.L. Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene / M.L. Norris, D.E. Millhorn // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 23774–23779.
233. O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase / S.L. Archer, H.L. Reeve, E. Michelakis et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – V. 96. – P. 7944–7949.
234. Oskarsson, A. Effects of cobalt chloride, nickel chloride, and nickel subsulfide upon erythropoiesis in rats / A. Oskarsson, M.C. Reid, F.W. Jr. Sunderman // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 1981. – V. 11, № 2. – P. 165–172.
235. Owen, C.A. Detection of ceruloplasmin after zone electrophoresis / C.A. Owen, H. Smith // *Clin. Chim. Acta.* – 1961. – V. 6. – P. 441–444.
236. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer / J.D. Firth, B.L. Ebert, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1994. – V. 91. – P. 6496–6500.
237. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1 / A. Rolfs, I. Kvietikova, M. Gassmann, R.H. Wenger // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 20055–20062.
238. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1 / D.E. Richard, E. Berra, E. Gothie et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 32631–32637.
239. p53 and HIF-1: transcription factors communicating at multiple levels / T. Schmid, M. Callapina, J. Zhou, B. Brune // *Oxygen and the Cell, Abstract Book.* – 2003. – Poster 17.
240. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake / H. Checkoway, K. Powers, T. Smith-Weller et al. // *Am. J. Epidemiol.* – 2002. – V. 155. – P. 732–738.
241. Parodi, P.W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention / P.W. Parodi // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – V. 13. – P. 813–828.

242. PBT434: a novel 8-hydroxyquinazolin-4(3H)-one provides robust neuroprotection in transgenic and toxin animal models of PD associated with reduced nigral alpha-synuclein and elevated PARK7(DJ-1) / R. Cherny, J. George, N. Critch et al. // *Neurodegener. Dis.* – 2011. – V. 8. – Suppl. 1.
243. Pedchenko, T.V. Desferrioxamine suppresses experimental allergic encephalomyelitis induced by MBP in SJL mice / T.V. Pedchenko, S.M. LeVine // *J. Neuroimmunol.* – 1998. – V. 84. – P. 188–197.
244. Pézenes, L. Some aspects on the relationship between lipids, neurotransmitters, and aging / L. Pézenes, H.D. Fischer, R.C. Noble // *Z. Gerontol.* – 1993. – V. 26, № 2. – P. 65–69.
245. Petschow, B.W. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level / B.W. Petschow, R.D. Talbott, R.P. Batema // *J. Med. Microbiol.* – 1999. – V. 48. – P. 541–549.
246. Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1 α isoform: implications for tumor promotion / Y.S. Chun, K.H. Lee, E.J. Choi et al. // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – P. 8700–8707.
247. Pihlajaniemi, T. Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis / T. Pihlajaniemi, R. Myllylä, K.I. Kivirikko // *J. Hepatol.* – 1991. – V. 13, Suppl. 3. – P. 2–7.
248. Presenilin-1 regulates induction of hypoxia inducible factor-1 α : altered activation by a mutation associated with familial Alzheimer's disease / R. De Gasperi, M.A. Sosa, S. Dracheva, G.A. Elder // *Mol. Neurodegener.* – 2010. – V. 5. – P. 38.
249. R. Paesano, E. Pacifici, S. Benedetti et al. Safety and efficacy of lactoferrin versus ferrous sulphate in curing iron deficiency and iron deficiency anaemia in hereditary thrombophilia pregnant women: an interventional study // *Biometals.* – 2014. – V. 27, № 5. – P. 999–1006.
250. Ratledge, C. Iron metabolism in pathogenic bacteria / C. Ratledge, L.G. Dover // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – V. 54. – P. 881–941.
251. Ravin, H.A. An improved colorimetric enzymatic assay for caeruloplasmin / H.A. Ravin // *J. Lab. Clin. Med.* – 1961. – V. 58. – P. 161–168.
252. Recent developments in iron chelation therapy / H. Cario, G. Janka-Schaub, G. Janssen et al. // *Klin. Padiatr.* – 2007. – V. 219. – P. 158–165.
253. Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier / C. Fillebeen, L. Descamps, M.P. Dehouck et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 7011–7017.
254. Rechsteiner, M. PEST sequences and regulation by proteolysis / M. Rechsteiner, S.W. Rogers // *Trends Biochem. Sci.* – 1996. – V. 21. – P. 267–271.
255. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2 / D. Feldser, F. Agani, N.V. Iyer et al. // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – P. 3915–3918.

256. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation / J.W. Jeong, M.K. Bae, M.Y. Ahn et al. // *Cell*. – 2002. – V. 111. – P. 709–720.
257. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1 / B. Krishnamachary, S. Berg-Dixon, B. Kelly et al. // *Cancer Res*. – 2003. – V. 63. – P. 1138–1143.
258. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes / C. Michiels, E. Minet, D. Mottet, M. Raes // *Free Radic. Biol. Med*. – 2002. – V. 33. – P. 1231–1242.
259. Regulation of growth differentiation factor 15 expression by intracellular iron / S. Lakhali, N.P. Talbot, A. Crosby et al. // *Blood*. – 2009. – V. 113. – P. 1555–15563.
260. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain / E.C. Vaux, E. Metzen, K.M. Yeates, P.J. Ratcliffe // *Blood*. – 2001. – V. 98. – P. 296–302.
261. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha / R. Ravi, B. Mookerjee, Z.M. Bhujwalla et al. // *Genes Dev*. – 2000. – V. 14. – P. 34–44.
262. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines / C. Blancher, J.W. Moore, K.L. Talks et al. // *Cancer Res*. – 2002. – V. 60. – P. 7106–7113.
263. Retinoblastoma susceptibility gene product pRB activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) / A. Budde, N. Schneiderhan-Marra, G. Petersen, B. Brüne // *Oncogene*. – 2005. – V. 24. – P. 1802–1808.
264. Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein / M.E. Bonicalzi, I. Groulx, N. de Paulsen, S. Lee // *J. Biol. Chem*. – 2001. – V. 276. – P. 1407–1416.
265. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis / P. Carmeliet, Y. Dor, J.M. Herbert et al. // *Nature*. – 1998. – V. 394. – P. 485–490.
266. Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration: implication for Parkinson's disease / D. Ben-Shachar, G. Eshel, P. Riederer, M.B. Youdim // *Ann. Neurol*. – 1992. – V. 32. – P. 105–110.
267. Ryle, M.J. Non-heme iron oxygenases / M.J. Ryle, R.P. Hausinger // *Curr. Opin. Chem. Biol*. – 2002. – V. 6, № 2. – P. 193–201.
268. Salceda, S. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes / S. Salceda, J. Caro // *J. Biol. Chem*. – 1997. – V. 272. – P. 22642–22647.
269. Salvador, G.A. Iron and mechanisms of neurotoxicity / G.A. Salvador, R.M. Uranga, N.M. Giusto // *Int. J. Alzheimers. Dis*. – 2010. – doi:10.4061/2011/720658.
270. SARI inhibits angiogenesis and tumour growth of human colon cancer through directly targeting ceruloplasmin / L. Dai, X. Cui, X. Zhang et al. // *Nat. Commun*. – 2016. – V. 7. – P. 11996.

271. Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications / N. Boddart, K.H. Le Quan Sang, A. Rötig et al. // *Blood*. – 2007. – V. 110. – P. 401–408.
272. Semenza, G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics / G.L. Semenza. – 2010. – *Oncogene*. – V. 29. – P. 625–634.
273. Semenza, G.L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences / G.L. Semenza // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – V. 59. – P. 47–53.
274. Semenza, G.L. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus / G.L. Semenza // *Cell*. – 2001. – V. 107. – P. 1–3.
275. Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia / G.L. Semenza // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – V. 88. – P. 1474–1480.
276. Semenza, G.L. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis / G.L. Semenza // *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* – 1994. – V. 8. – P. 863–884.
277. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / G.L. Semenza // *Nat. Rev. Cancer*. – 2003. – V. 3, № 10. – P. 721–732.
278. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha / P.J. Kallio, K. Okamoto, S. O'Brien et al. // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – P. 6573–6586.
279. Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers / M. Kostka, T. Hogen, K.M. Danzer et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – P. 10992–11003.
280. Small-molecule inhibitors of HIF-2a translation link its 5'-UTR iron-responsive element to oxygen sensing / M. Zimmer, B.L. Ebert, C. Neil et al. // *Mol. Cell*. – 2008. – V. 32. – P. 838–848.
281. Smith, D.G. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide / D.G. Smith, R. Cappai, K.J. Barnham // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2007. – V. 1768. – P. 1976–1990.
282. Solomon, E.I. Non-heme iron enzymes: contrasts to heme catalysis / E.I. Solomon, A. Decker, N. Lehnert // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – V. 100, № 7. – P. 3589–3594.
283. Son, H.J. Human lactoferrin controls the level of retinoblastoma protein and its activity / H.J. Son, S.H. Lee, S.Y. Choi // *Biochem. Cell. Biol.* – 2006. – V. 84. – P. 345–350.
284. Sorensen, M. The proteins in whey. // M. Sorensen, M.P.L. Sorensen // *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*. – 1939. – V. 23. – P. 55–59.
285. Specific antiserum staining of two-dimensional electrophoretic patterns of human plasma proteins immobilized on nitrocellulose / N.L. Anderson, S.L. Nance, T.W. Pearson, N.G. Anderson // *Electrophoresis*. – 1982. – V. 3. – P. 135–142.
286. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL / W.C. Hon, M.I. Wilson, K. Harlos et al. // *Nature*. – 2002. – V. 417. – P. 975–978.

287. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling / J.H. Min, H. Yang, M. Ivan et al. // *Science*. – 2002. – V. 296. – P. 1886-1889.
288. Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay / D. Ehrismann, E. Flashman, D.N. Genn et al. // *Biochem. J.* – 2007. – V. 401, № 1. – P. 227–234.
289. Sunderman, F.W. Jr. Carcinogenicity of nickel compounds in animals / F.W. Jr. Sunderman // *IARC Sci. Publ.* – 1984. – V. 53. – P. 127–142.
290. Suzuki, Y.A. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function / Y.A. Suzuki, V. Lopez, B. Lonnerdal // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – V. 62. – P. 2560–2575.
291. Systemic regulation of hephaestin and IREG1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency / H. Chen, T. Su, Z.K. Attieh et al. // *Blood*. – 2003. – V. 102. – P. 1893-1899.
292. Talactoferrin alfa, a recombinant human lactoferrin promotes healing of diabetic neuropathic ulcers: a phase 1/2 clinical study / T.E. Lyons, M.S. Miller, T. Serena et al. // *Am. J. Surg.* – 2007. – V. 193. – P. 49–54.
293. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators / O. Weinreb, S. Mandel, M.B. Youdim, T. Amit // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – V. – 62. – P. 52. – 64.
294. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation / P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.M. Tian et al. // *Science*. – 2001. – V. 292. – P. 468–472.
295. TCDD induces cell migration via NFATc1/ATX-signaling in MCF-7 cells / A. Seifert, S. Rau, G. Küllertz et al. // *Toxicol Lett.* – 2009. – V. 184. – P. 26–32.
296. Tea consumption and cognitive impairment and decline in older Chinese adults / T.P. Ng, L. Feng, M. Niti et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – V. 88. – P. 224–231.
297. Teng, C.T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview / C.T. Teng // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80. – P. 7–16.
298. The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption / G.J. Anderson, D.M. Frazer, A.T. McKie, C.D. Vulpe // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2002. – V. 29. – P. 367–375.
299. The contribution of VHL substrate binding and HIF1- α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma / J.K. Maranchie, J.R. Vasselli, J. Riss et al // *Cancer Cell*. – 2002. – V. 1, № 3. – P. 247–255.
300. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development / H. Tian, R.E. Hammer, A.M. Matsumoto et al. // *Genes Dev.* – 1998. – V. 12. – P. 3320–3324.

301. The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons / D. Ben-Shachar, G. Eshel, J.P. Finberg, M.B. Youdim // *J. Neurochem.* – 1991. – V. 56. – P. 1441–1444.
302. The medicinal chemistry of novel iron chelators for the treatment of cancer / Z. Kovacevic, D.S. Kalinowski, D.B. Lovejoy et al. // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. – V. 11. – P. 483–499.
303. The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signaling / K.S. Hewitson, L.A. McNeill, J.M. Elkins, C.J. Schofield // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – V. 31, Pt 3. – P. 510–515.
304. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia / F.H. Agani, P. Pichiule, J.C. Chavez, J.C. LaManna // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 35863–35867.
305. The structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution / B.F. Anderson, H.M. Baker, E.J. Dodson et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1984. – V. 84. – P. 1769–1773.
306. The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins / K.N. White, C. Conesa, L. Sánchez et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1820. – P. 411–416.
307. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis / P.H. Maxwell, M.S. Wiesener, G.W. Chang et al. // *Nature.* – 1999. – V. 399. – P. 271–275.
308. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase / A. Gorlach, I. Diebold, V.B. Schini-Kerth et al. // *Circ. Res.* – 2001. – V. 89. – P. 47–54.
309. Tian, H. Endothelial PAS domain protein 1, a transcription factor selectively expressed in endothelial cells / H. Tian, S.L. Mcknight, D.W. Russel // *Genes Dev.* – 1997. – V. 11. – P. 72–82.
310. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Semenza, P.H. Roth, H.M. Fang, G.L. Wang // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, № 38. – P. 23757–23763.
311. Trans-endothelial and trans-epithelial transfer of lactoferrin into the brain through BBB and BCSFB in adult rats / N. Kamemori, T. Takeuchi, A. Sugiyama et al. // *J. Vet. Med. Sci.* – 2008. – V. 70. – P. 313–315.
312. Transferrin receptor induction by hypoxia: HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific posttranscriptional regulation / L. Tacchini, L. Bianchi, A. Bernelli-Zazzera, G. Cairo // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 24142–24146.
313. *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferring / J. Tachezy, J. Kulda, I. Bahnikova et al. // *Exp. Parasitol.* – 1996. – V. 83. – P. 216–228.
314. Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption / S. Cherukuri, R. Potla, J. Sarkar et al. // *Cell Metabolism.* – 2005. – V. 2. – P. 309–319.

315. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds / D. Lison, M. De Boeck, V. Verougstraete, M. Kirsch-Volders // *Occup. Environ. Med.* – 2001. – V. 58, № 10. – P. 619–625.
316. Up-regulation of pro-inflammatory genes as adaptation to hypoxia in MCF-7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment / M. Tafani, A. Russo, M. Di Vito et al. // *Cancer Sci.* – 2010. – V. 101. – P. 1014–1023.
317. Van Snick, J.L. The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation / J.L. Van Snick, P.L. Masson, J.F. Heremans // *J. Exp. Med.* – 1974. – V. 140. – P. 1068–1084.
318. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis / J. Josko, B. Gwozdz, H. Jedrzejowska-Szypulka, S. Hendryk // *Med. Sci. Monit.* – 2000. – V. 6. – P. 1047–1052.
319. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors / G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak // *FASEB J.* – 1999. – V. 13. – P. 9–22.
320. Wang G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia / G.L. Wang, G.L. Semenza // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – V. 90, № 9. – P. 4304–4308.
321. Wang, G.L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction / G.L. Wang, G.L. Semenza // *Blood.* – 1993. – V. 82. – P. 3610–3615.
322. Wang, G.L. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Wang, B.H. Jiang, G.L. Semenza // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – V. 216. – P. 669–675.
323. Wang, G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1 / G.L. Wang, G.L. Semenza // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270, № 3. – P. 1230–1237.
324. Ward, R.J. Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators / R.J. Ward, D.T. Dexter, R.R. Crichton // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2015. – V. 31. – P. 267–273.
325. Wenger, R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression / R.H. Wenger // *FASEB J.* – 2002. – V. 16. – P. 1151–1162.
326. Williams, D.R. Metals, ligands, and cancer / D.R. Williams // *Chem. Rev.* – 1972. – V. 72, № 3. – P. 203–213.
327. Y. Takahashi, S. Takahashi, Y. Shiga et al. Hypoxic induction of prolyl-4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells / *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 14139–14146.
328. Yuan, Y. Hypoxia-inducible factor 2alpha binds to cobalt in vitro / Y. Yuan, D. Beitner-Johnson, D.E. Millhorn // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 288, № 4. – P. 849–854.