

Войнова Ирина Витальевна

**ОСОБЕННОСТИ ПАРАМЕТРОВ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ
1.5.4 – Биохимия**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины»

Научный руководитель:

Соколов Алексей Викторович – доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Шаройко Владимир Владимирович – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра общей и биоорганической химии, профессор; Научно-образовательный институт биомедицины, лаборатория биомедицинского материаловедения, ведущий научный сотрудник;

Шпаков Александр Олегович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, заместитель директора по науке, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр. д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12 и на сайте

<https://iemspsb.ru/external/voinova-iv>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

В. Н. Мухин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сахарный диабет 2 типа (или инсулиннезависимый сахарный диабет, СД2) – заболевание, характеризующееся хронической гипергликемией, которая обусловлена относительной инсулиновой недостаточностью и инсулинорезистентностью, и как правило наследственной предрасположенностью. На конец 2020 года в Российской Федерации СД2 страдало 4,4 млн. человек, что составляет более 3% населения [Дедов и соавт., 2021]. По данным Международной Федерации Диабета в 2021 году среди населения старше 20 лет сахарным диабетом болели почти 10%, а смертность от осложнений сахарного диабета составила 6,7 млн. случаев.

Осложнения СД2: ретинопатия, нефропатия, синдром диабетической стопы и макрососудистая патология, обусловлены нарушениями метаболизма, в том числе нормального оттока железа от тканей, и приводят к снижению качества жизни пациентов и их инвалидизации. С развитием СД2 ассоциированы нарушения обмена железа, в том числе наследственной этиологии [Alfadhel, et al., 2018]. Например, развитие СД2 отмечается в 80% случаев наследственного гемохроматоза, причиной которого являются мутации в генах, отвечающих за обмен железа: *HFE* (фактор гемохроматоза), *HAMP* (гепцидин), *TFR2* (рецептор трансферрина), *SLC40A1* (ферропортин) и *HFE2* (гемоювелин) [Alfadhel, et al., 2018]. Функциональные дефекты гена церулоплазмينا (*Cp*), продукт которого проявляет феррооксидазную активность в плазме крови, также приводят к развитию СД2 при ацерулоплазминемии [Xiao, et al., 2022]. Недавно было показано, что двойной нокаут по генам *Cp* и его гомолога гестина (*Hp*) приводит к развитию симптомов СД2 у мышей [Zheng, et al., 2018].

Хроническая гипергликемия при СД2 приводит к неферментативной ковалентной модификации биополимеров как глюкозой, так и продуктами ее окисления: глиоксалем, метилглиоксалем и другими [Brings, et al., 2017]. Процентное содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) признано биохимическим критерием выраженности хронической гипергликемии и ее компенсации [Gupta, et al. 2017]. Предшествующим СД2 либо скомпенсированному препаратами считается диапазон $5,7\% < \text{HbA1c} < 6,4\%$, а для диабета характерно значение $\text{HbA1c} \geq 6,5\%$ [Дедов, и соавт., 2002]. Из-за относительно низкой скорости обновления эритроцитов (период полужизни около 60-90 дней) постоянное повышение концентрации глюкозы приводит к достоверному увеличению доли HbA1c. Однако неферментативному гликированию подвергаются и другие белки, например, альбумин плазмы крови [Pandey, et al., 2015]. Альбумин, является основным транспортером ионов меди в плазме крови, а обмен меди и железа тесно связан за счет феррооксидазной активности мультимедной оксидазы – Cp [Kirsipuu, et al., 2020]. Хотя Cp напрямую не взаимодействует с Tf, его основной физиологической функцией считается ускорение встраивания в Tf железа [Osaki, 1966]. Учитывая, что снижение активности Cp компенсируется феррооксидазной активностью, ассоциированной с

липопротеинами низкой плотности (LDL) при наследственных патологиях обмена меди [Torham, et al., 1970], не менее актуально исследование связи СД2 с изменением концентрации холестерина.

Степень разработанности темы исследования. Было показано нарушение функций Ср, связанное с агрегацией, потерей ферментом ионов меди и как следствие сниженной ферроксидазной активностью, при модификации метилглиоксалем и аминокетоном, концентрация которых в плазме крови возрастает при СД2 [Dutra, et al., 2005; Sanda et al., 2022]. Повышение концентрации несвязанной с Ср меди было обнаружено при исследовании сыворотки крови пациентов с СД2 и болезнью Альцгеймера [Squitti, et al., 2017]. Недавно были идентифицированы сайты гликирования в Ср и Tf у пациентов с СД2 [Golizeh, et al., 2017; Silva, et al., 2018]. Однако существенных корреляций между HbA1c и концентрацией железа в сыворотке, а также между HbA1c и насыщением Tf железом обнаружено не было [Misra, et al., 2016]. Данное исследование было проведено в 2014-2019 годах, в связи, с чем результаты более поздних работ [Ma, et al., 2022] не могли быть учтены нами при планировании исследования.

Цель исследования: определить особенности биохимических параметров метаболизма железа в зависимости от наличия гипергликемии и ее компенсации.

Задачи исследования:

1. Определить в крови биохимические показатели обмена железа и меди, углеводов у пациентов с хронической гипергликемией и пациентов без признаков хронической гипергликемией, а также исследовать корреляционные связи показателей.

2. Установить, может ли взаимодействие церулоплазмينا и трансферрина быть фармакологической мишенью для коррекции железодефицита.

3. Исследовать влияние гликирования *in vitro* на функциональную активность церулоплазмينا и трансферрина.

4. На стрептозотоциновой модели гипергликемии у крыс определить (в крови) биохимические показатели обмена железа и меди, углеводов, а также антиоксидантной системы. Оценить антигликемический и антиоксидантный эффекты рекомбинантного апо-лактоферрина.

Научная новизна. Впервые проведен системный анализ изменения биохимических показателей, характеризующих обмен железа в плазме крови, выявлены корреляционные связи этих показателей в зависимости от степени компенсации гипергликемии при инсулиннезависимом сахарном диабете. Впервые показано, что сильная отрицательная связь между концентрацией Fe и Tf у условно здоровых доноров изменила направление на положительную корреляцию у пациентов с компенсированным СД2. Продемонстрировано изменение показателей обмена железа у крыс с моделью гипергликемии, вызванной инъекцией стрептозотоцина. Показано снижение концентрации глюкозы, а также нивелирование изменений активностей глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы лактоферрином у животных с гипергликемией. Впервые выполнено гликирование церулоплазмينا *in vitro* и показано снижение его ферментативной активности,

коррелирующее с накоплением в белке фруктозамина. С помощью поверхностного плазмонного резонанса, как наиболее чувствительного метода исследования белок-белковых взаимодействий, а также создания равновесных условий при гель-фильтрации впервые показано, что наиболее благоприятные для взаимодействия условия не приводят к образованию стабильного комплекса между церулоплазмином и трансферрином. Впервые данными методами изучено эталонное взаимодействие между церулоплазмином и гомологом трансферрина – лактоферрином.

Теоретическая и практическая значимость исследования. В проведенном исследовании выявлены связи между степенью компенсации СД2 и параметрами, характеризующими обмен железа в плазме крови. При выполнении исследования для групп здоровых доноров и пациентов с СД2 обнаружены отличия уравнений регрессии, связывающих концентрацию меди, церулоплазмина и его ферроксидазную активность, а также концентрацию железа, трансферрина и железосвязывающей способности сыворотки. Обнаруженное при анализе биохимических показателей достоверное снижение удельной железосвязывающей способности трансферрина при развитии гипергликемии, которое удалось выявить при сопоставлении железосвязывающей способности сыворотки и концентрации трансферрина, свидетельствует о том, что применяемые в настоящее время методы оценки обмена железа не отражают нарушения обмена железа. Выявленные антигликемический и антиоксидантный эффекты лактоферрина перспективны для коррекции нарушений, вызванных СД2.

Методология и методы исследования. При использовании биохимических, иммунологических и электрофоретических методов были определены показатели обмена железа и меди, углеводного обмена, антиоксидантной системы в биологическом материале, полученном от доноров и лабораторных животных. Были использованы методы моделирования: стрептозотоциновая модель гипергликемии у крыс, гликирование церулоплазмина и трансферрина *in vitro*. Препаративные, иммунологические и электрофоретические методы были использованы для выделения и очистки белков крыс и человека. Взаимодействие высокоочищенных препаратов церулоплазмина, трансферрина и лактоферрина человека изучено методами поверхностного плазмонного резонанса и равновесной гель-фильтрации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Некомпенсированная гипергликемия сопровождается снижением удельной активности основных участников обмена железа – церулоплазмина и трансферрина.
2. Увеличение степени гликирования гемоглобина коррелирует с нарушением активности трансферрина и меняет характер зависимости между его концентрацией и концентрацией ионов железа у пациентов с некомпенсированной гипергликемией.
3. В отличие от лактоферрина, между трансферрином и церулоплазмином не образуется стабильного комплекса.
4. Гликирование *in vitro* снижает активность церулоплазмина, но не трансферрина.

5. Моделирование гипергликемии у крыс сопровождается снижением удельных активностей церулоплазмينا и трансферрина, а также показателей антиоксидантной защиты. Апо-лактоферрин оказывает антигликемический и антиоксидантный эффекты, корректируя концентрацию глюкозы, активность церулоплазмينا и антиоксидантных ферментов.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволил оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Материалы диссертационной работы были представлены на: VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» (3-5 декабря 2015, Санкт-Петербург, Россия); Научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА(19-20 апреля 2016, Москва, Россия); III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (12-14 сентября 2016, Санкт-Петербург, Россия); II Международной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (19-20 октября 2017, Минск, Беларусь); XIII International Conference on Lactoferrin: Structure, Function & Applications (5-10 ноября 2017, Рим, Италия); XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (14 апреля 2018, Санкт-Петербург, Россия); II Белорусском биохимическом конгрессе. Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии(17-18 мая 2018, Гродно, Беларусь); XXII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (20 апреля 2019, Санкт-Петербург, Россия). По теме диссертационного исследования опубликовано 12 научных работ, в том числе 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертации, из них 1 – в журнале индексируемом в базе данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад соискателя. Автор проанализировал литературу по проблеме исследования, осуществил планирование экспериментов и получил основную часть результатов, которые представил в докладах на конференциях и опубликовал в научных статьях. Соискателем были модифицированы фотометрические методы определения аналитов сыворотки крови человека и крысы; получены аффинные сорбенты, с использованием которых выделены белковые препараты и получены моноспецифические поликлональные антитела к ним; разработаны методы выделения и очистки белков; оптимизированы методы определения активности ферментов; проведена биохимическая оценка свойств изучаемых белковых комплексов; отработаны методы определения белков с помощью иммуноферментного анализа; подготовлены образцы для проведения поверхностного плазмонного резонанса; проведена статистическая обработка полученных данных.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список сокращений» «Список литературы», включающий 485 источников, из них – 8 отечественных, и «Приложение». Диссертация изложена на 192 страницах печатного текста. Результаты диссертации представлены в 10 таблицах и иллюстрированы 19 рисунками.

Финансовая поддержка и благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта президента РФ: МК-5874.2018.4, а также программы РАМН «Протеом человека».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные группы. В исследование был включен биоматериал от 364 человек: в группу 1 вошло 110 человек без СД2 ($HbA1c < 5,8\%$), в группу 2 – 195 пациентов с компенсированным СД2 ($5,9\% < HbA1c < 6,9\%$), в группу 3 – 59 пациентов с некомпенсированным СД2 ($HbA1c > 6,9\%$). Критерием исключения образцов биологического материала из настоящего исследования являлась концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови более 10 мг/л.

Моделирование гипергликемии у крыс. Использована модель стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета [Akbarzadeh, et al., 2007]. Эксперименты выполнены на 80 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 5 недель массой 120-150 г, использовали инъекцию раствора стрептозотоцина моногидрата (STZ) из расчета 43 мг/кг массы. Было использовано три варианта введения лактоферрина (Lf): 1) терапевтическая – доза 50 мг/кг ежедневно с 1 по 5 день от введения STZ (по 8 крыс в опытной и контрольной группе); 2) профилактическая – доза 250 мг/кг за 5 дней до введения STZ (по 8 крыс в опытной и контрольной группе); 3) смешанная – доза 250 мг/кг за 5, 3, 1 дней до и через 2, 4, 6 и 8 дней после введения STZ (по 7 крыс в опытной и контрольной группе).

Фотометрические методы. Активность Сp в отношении п-фенилендиамина (p-PD) оценивали по образованию окрашенного в фиолетовый цвет продукта конденсации с субстратом [Varfolomeeva, et al., 2016]. Ферроксидазную активность Сp (FerOx) оценивали по способности Сp окислять Fe^{2+} , при этом концентрацию неокисленного Сp Fe^{2+} измеряли фотометрически за счет образования окрашенного комплекса Fe^{2+} с феррозином [Erel, 1998]. Определение концентрации меди в сыворотке крови проводили колориметрическим методом с diBr-PAESA [Abe, et al., 1989]. Определение концентрации железа в сыворотке крови проводили колориметрическим методом с Nitro-PAPS [Yamashita, et al., 1992]. Определение общей железо-связывающей способности сыворотки крови проводили путем колориметрического определения концентрации железа после выдерживания сыворотки крови в растворе трехвалентного железа, при котором происходит насыщение Tf, избыток несвязанного с Tf железа удаляли сорбцией на карбонате магния. Определение концентрации Hb в крови проводили унифицированным колориметрическим

методом, при котором Hb под действием феррицианида и цианида калия превращается в цианметгемоглобин [Van Kampen, et al., 1965]. Определение концентрации свободных SH-групп проводили с помощью реактива Элмана [Hu, 1994]. Активность глутатионпероксидазы измеряли убыли глутатиона (GSH) и нормировали на Hb [Гаврилова и Хмара, 1986]. Активность глутатион-S-трансферазы измеряли по образованию комплекса GSH и 1-хлор-2,4-динитробензола и нормировали на Hb [Habig, et al., 1974]. Определение концентрации Tf проводили иммунотурбидиметрическим методом, при котором Tf в результате реакции преципитации формирует нерастворимые иммунные комплексы антителами козы против Tf человека. Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) проводили иммунотурбидиметрическим методом с использованием набора «СРБ-Витал» (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия), при котором СРБ в результате реакции преципитации формирует нерастворимые иммунные комплексы антителами козы против СРБ человека. Определение процентной доли HbA1c в цельной крови было выполнено сотрудниками биохимической лаборатории Диагностического центра №1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе D-10 с использованием соответствующих реагентов фирмы Bio-Rad Laboratories (США). Определение степени гликирования белков проводили модифицированным колориметрическим методом, при котором нитросиний тетразолий взаимодействует с фруктозаминами сыворотки крови с образованием окрашенного формазана [Фельдкорен, и соавт., 1988]. Определение концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности в сыворотке (плазме) крови энзиматическим колориметрическим методом с иммуноингибированием, без осаждения проводили с использованием набора «HDL-холестерин-Витал» (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия). Определение концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности (LDL) в сыворотке (плазме) крови энзиматическим колориметрическим методом с селективной защитой, без осаждения проводили с использованием набора «LDL-холестерин-ВИТАЛ» (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия). Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс для контроля развития СД2 глюкозооксидазным методом без депротеинизации проводили с использованием набора «ГЛЮКОЗА-ВИТАЛ» (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия).

Иммунохимические методы. Определение концентрации Ср человека проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини, который основан на реакции преципитации в агарозном геле между радиально диффундирующими антигенами и специфическими по отношению к ним антителами [Mancini, et al, 1965]. Определение концентрации ферритина, Ср и Tf крысы проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. Схема проведения анализа включала сорбцию антигена в лунках полистирольного планшета, покрытых антителами, блокировку свободных участков планшета, инкубацию со специфическими к анализируемому антигену антителами кролика, инкубацию с антивидовыми антителами осла, конъюгированными с ферментативной меткой, окрашивание раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, остановку

реакции добавлением кислоты. Для определения концентрации ферритина, Ср и Tf крысы были выделены соответствующие белки крысы и получены антитела кролика к соответствующим белкам крысы.

Выделение белков крыс. Выделение ферритина из печени крыс проводили по методу, включавшему денатурацию балластных белков, диализ и две гель-фильтрации ферритина на колонке с BioGel-1,5m [Craig, et al., 1985]. Выделение Ср крыс проводили по модифицированному методу, включавшему ионообменную хроматографию на колонке со смолой UNO-Sphere Q (Bio-Rad) и аффинную хроматографию на неомицин-агарозе [Соколов, и соавт., 2012]. Выделение Tf крыс проводили по модифицированному методу, включавшему хроматографию на DEAE-Sephadex A-50, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрацию [Baker, et al., 1968].

Получение антител к белкам крыс. Иммунизацию животных с целью получения антител к Ср, Tf и ферритина крысы проводили по методу [Захарова, и соавт., 1983]. Для выделения специфических антител использовали методы аффинной хроматографии. В качестве аффинного сорбента использовали BrCN-активированную агарозу со связанными белками крысы (Ср, Tf либо ферритином). Перекрестная специфичность выделенных антител к белкам (Ср, Tf либо ферритину) крысы была проверена методами иммуноферментного анализа.

Гликирование церулоплазмينا и трансферрина *in vitro* проводили путем инкубации растворов белков с различными концентрациями глюкозы в диапазоне 0-30 mM в течение недели при 4°C и 37°C. После инкубации определяли п-фенилендиоксидазную и ферроксидазную активности Ср, железо-связывающую способность Tf, концентрацию фруктозамина, а также проводили ЭФ в ПААГ полученных проб с последующим выявлением оксидазной активности Ср методом окрашивания раствором о-дианизидина.

Изучение взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека. Для оценки взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека применяли метод поверхностного плазмонного резонанса с использованием чипов с карбоксиметилированным декстраном (СМ5) на приборе «Viascope X100» с двойной проточной ячейкой («GE-Healthcare», США), на одну из частей ячейки с помощью карбодиимида иммобилизовали Ср. Итоговый уровень иммобилизации составил 3340 резонансных единиц (RU), что соответствует 3,3 нг Ср на 1 мм² поверхности чипа. С целью характеристики аффинности над покрытым Ср чипом со скоростью 10 мкл/мин в буфере HEPES-NaOH (pH 7.5), содержащем натрия хлорид, инъецировали возрастающие концентрации аналита (А) – апо-формы Tf (1,6–51,3 мкМ). Часть проточной ячейки без иммобилизованного Ср использовалась как контрольная для определения неспецифического связывания А с чипом (<2% от R_{max}). Для проверки способности системы детектировать взаимодействия был использован гомолог Tf – лактоферрин человека.

Для оценки взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека применяли метод равновесной гель-фильтрации. На колонку с Sephacryl S-200 HR был нанесен образец в объеме 0,2

мл, содержащий 30 мкМ Ср и 51,3 мкМ Tf, элюцию проводили раствором, содержащем HEPES-NaOH, натрия хлорид и 51,3 мкМ апо-формы Tf. Во фракциях элюата регистрировали поглощение при длинах волн 280 нм и 610 нм. Фракции исследовали с помощью диск-электрофореза в щелочной среде, после чего Ср-содержащие зоны окрашивались о-дианизидином. Для доказательства того, что использованная система способна детектировать взаимодействия в качестве положительного контроля колонка была уравновешена 51,3 мкМ лактоферрином человека.

Статистическая обработка данных осуществлялась при помощи пакета программ Statistica (версия 10.0). Гипотезу о виде распределения проверяли с помощью критерия Колмогорова. Для данных, подчиняющимся нормальному распределению, результаты представляли в виде среднего значения величины (M) и ошибки среднего (m) или строили доверительный интервал; для выявления различий между тремя несвязанными группами применяли однофакторный дисперсионный анализ с posthoc критерием Бонферрони. Для данных, не подчиняющимся нормальному распределению, результаты представляли в виде медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего квартилей (Q2); для выявления различий между двумя несвязанными группами применялся U-критерий Манна-Уитни. Для оценки тесноты корреляционной связи между изучаемыми признаками, в случае принятия гипотезы о нормальности распределения, вычисляли коэффициент линейной корреляции Пирсона – r. При анализе взаимосвязей между двумя количественными признаками применяли метод линейной регрессии; при исследовании множественных связей между одним количественным и подмножеством количественных признаков – метод множественной линейной регрессии с использованием алгоритма пошагового отбора предикторов. Критическое значение уровня значимости везде принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дисперсионный и корреляционный анализ показателей метаболизма железа у здоровых пациентов и пациентов с различной степенью компенсации сахарного диабета 2 типа. С помощью аналитических методов были изучены концентрации и активности основных участников обмена железа и связанные с ними биохимические параметры в образцах цельной крови и ее сыворотке, полученных от здоровых доноров и от пациентов с различной степенью компенсации СД2. В таблице 1 суммированы данные о средних значениях показателей, полученных при выполнении данного исследования.

Концентрация Ср увеличена в группе 3 по сравнению с группами 1 и 2. Оксидазная активность Ср в отношении пара-фенилендиамина (p-PD), ферроксидазная активность Ср и концентрация Сиснижены в группах 2 и 3 по сравнению с контролем. Снижается удельная ферроксидазная активность Ср (FerOx/Ср), удельная активность в отношении p-PD (p-PD/Ср) и насыщение Ср ионами меди (Cu/Ср) по мере увеличения доли HbA1c.

Таблица 1. Показатели и значимость их различий в группе 1 (здоровые доноры), группе 2 (компенсированный сахарный диабет) и группе 3 (некомпенсированный сахарный диабет) с применением критерия Бонферрони

Показатель	M±SEM			Уровень значимости, p		
	Группа 1 (N=110)	Группа 2 (N=195)	Группа 3 (N=59)	p1-2	p1-3	p2-3
Гликированный гемоглобин A1c, %	4,57±0,08	6,29±0,02	8,33±0,20	0,000	0,000	0,000
Церулоплазмин (Cp), мкМ	3,5±1,1	3,5±0,9	3,9±0,6	NS	0,010	0,003
Железо (Fe), мкМ	18,2±0,6	18,9±0,3	18,62±0,8	NS	NS	NS
Ферроксидазная активность Cp (FeOx), Е/л	817±23	712±13	697±14	0,000	0,000	NS
p-PD-оксидазная активность Cp (p-PD), мкМ	3,5±1,1	3,2±0,9	3,1±0,5	0,003	0,004	NS
FeOx/p-PD, Е/мкмоль	235,9±4,4	228,1±2,2	228,8±2,8	NS	NS	NS
Холестерин HDL, мМ	1,48±0,04	1,39±0,03	1,28±0,05	NS	0,008	NS
Холестерин LDL, мМ	3,26±0,12	3,38±0,09	3,43±0,17	NS	NS	NS
Медь (Cu), мкМ	20,6±0,7	17,8±0,4	17,5±0,4	0,000	0,003	NS
Общая железосвязывающая способность (ТIBC), мкМ	49,0±0,6	47,3±0,5	47,0±0,7	NS	NS	NS
Трансферрин (Tf), мкМ	32,2±6,4	39,3±6,8	49,5±7,7	0,000	0,000	0,000
p-PD/Cp, моль/моль	1,02±0,01	0,91±0,01	0,78±0,01	0,000	0,000	0,000
ТIBC/Tf, моль/моль	1,62±0,02	1,29±0,01	1,02±0,01	0,000	0,000	0,000
Cu/Cp, моль/моль	5,99±0,01	5,15±0,01	4,49±0,02	0,000	0,000	0,000
FeOx/Cp, Е/мкмоль	241,5±5,2	208,3±2,1	178,6±2,8	0,000	0,000	0,000
Fe/ТIBC, моль/моль	0,38±0,15	0,41±0,13	0,40±0,12	NS	NS	NS
Fe/Tf, моль/моль	0,62±0,03	0,50±0,01	0,38±0,02	0,000	0,000	0,003

Примечание: NS – уровень значимости выше критического значения, 0,000 – значащая цифра находится правее 3-го разряда.

Выявленная сильная положительная корреляция концентрации меди и концентрации Cp в сыворотке крови (рис. 1) у пациентов в группе 1 ($r=0,93$) и пациентов в группе 2 ($r=0,89$) в группе 3 выражена слабее ($r=0,62$). Полученные результаты подтверждаются достоверным снижением значения коэффициента при показателе Cp в уравнении одномерной регрессии концентрации ионов меди в сыворотке крови на концентрации Cp (табл. 2).

Таблица 2. Уравнения одномерной линейной регрессии концентрации меди (Cu, мкМ) на концентрации Cp (Cp, мкМ) с учетом стандартной ошибки в группе 1 (здоровые доноры), группе 2 (компенсированный сахарный диабет) и группе 3 (некомпенсированный сахарный диабет)

Группа	Уравнение	Уровень значимости параметров
1 (N=110)	$Cu=(5,54\pm0,21)\times Cp$	$p=0,000$
2 (N=195)	$Cu=(5,06\pm0,18)\times Cp$	$p=0,000$
3 (N=59)	$Cu=(3,03\pm0,52)\times Cp + (5,62\pm2,07)$	$p=0,000$ и $p=0,009$

Примечание: уровни значимости при сопоставлении параметров уравнения регрессии $p_{12}=0,000$, $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,000$.

В случае группы 1 обнаруживается близкое к ожидаемому отношение 6 моль меди на 1 моль Ср, по мере усиления гипергликемии количество ионов меди, приходящихся на 1 молекулу Ср, снижается.

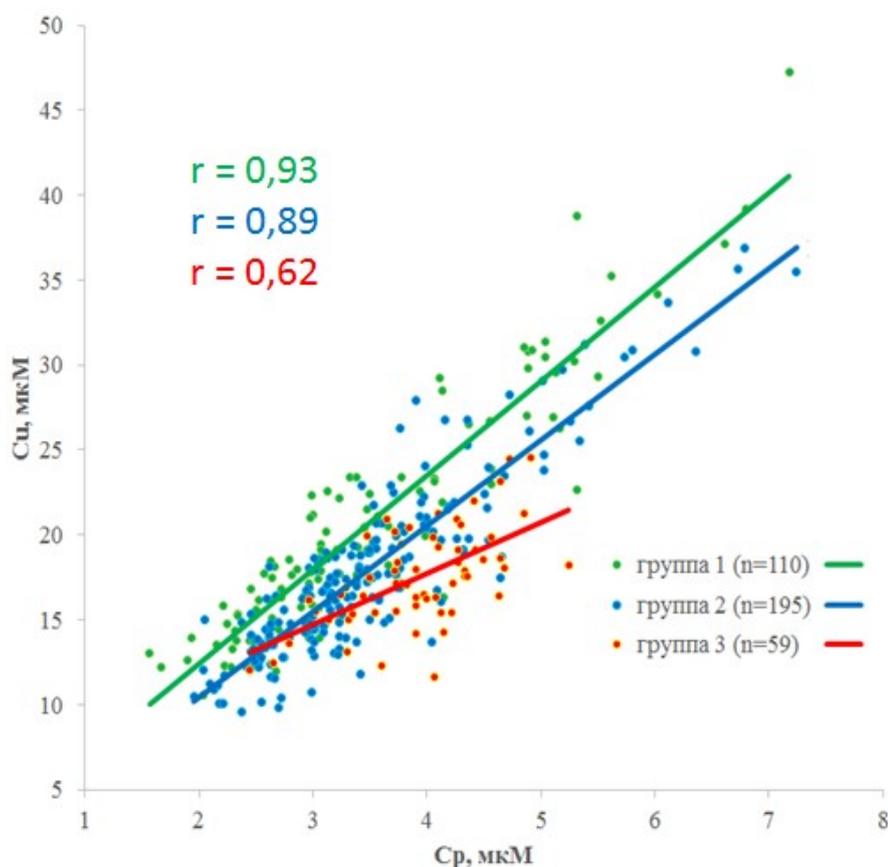


Рисунок 1. Диаграмма рассеяния активности Ср в отношении р-PD на концентрации Ср

Концентрация Tf была выше у пациентов в группах 2 и 3 по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1). Отношение ТIBC к Tf и отношение концентрации Fe к Tf, характеризующие удельную способность Tf связывать Fe(III), снижались у пациентов групп 2 и 3 по сравнению со здоровыми донорами. Молекула Tf способна связывать 2 иона железа, и если у здоровых доноров этот показатель составил 1,6 моль Fe на 1 моль Tf, то в группах 2 и 3 он снизился до 1,29 и 1 моль Fe на 1 моль Tf, соответственно.

Сильные корреляционные связи выявлены между отношениями концентрации Fe к концентрации Tf (Fe/Tf) и концентрации Fe к ТIBC (Fe/ТIBC) (рис. 2), при этом корреляционные связи между Tf и ТIBC выражены слабее (рис. 3).

Поскольку одна молекула Tf связывает 2 иона железа, то наклон линейной регрессии на рисунке 2 в норме должен быть близок к 0,5. Полученные результаты подтверждаются достоверным изменением коэффициентов регрессии в уравнении одномерной линейной регрессии насыщения Tf железом (Fe/Tf) и отношения концентрации железа к ТIBC (Fe/ТIBC) (табл. 3).

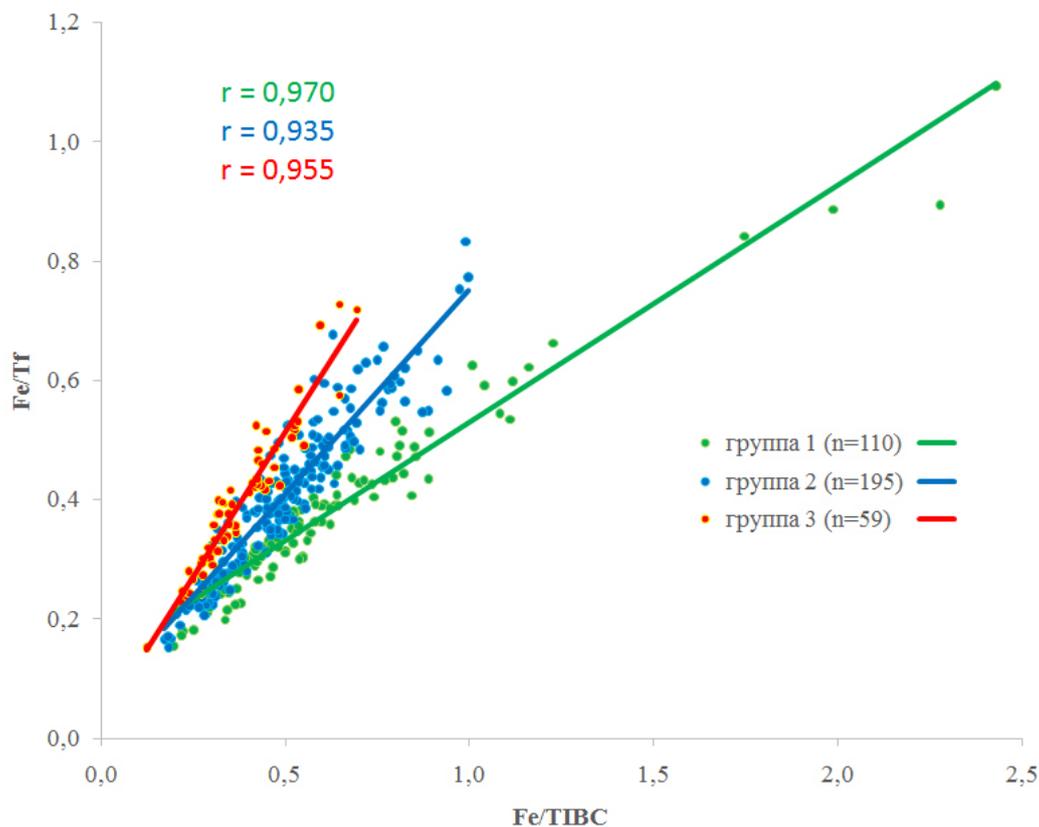


Рисунок 2. Диаграмма рассеяния насыщения Tf железом (Fe/Tf) на отношении концентрации Fe к ТIBC (Fe/ТIBC)

Таким образом, именно насыщение Tf, оцениваемое по отношению концентрации железа к концентрации Tf, а не насыщение Tf, оцениваемое по отношению концентрации железа к ТIBC, позволило выявить изменение железо-связывающей функции Tf при развитии диабета.

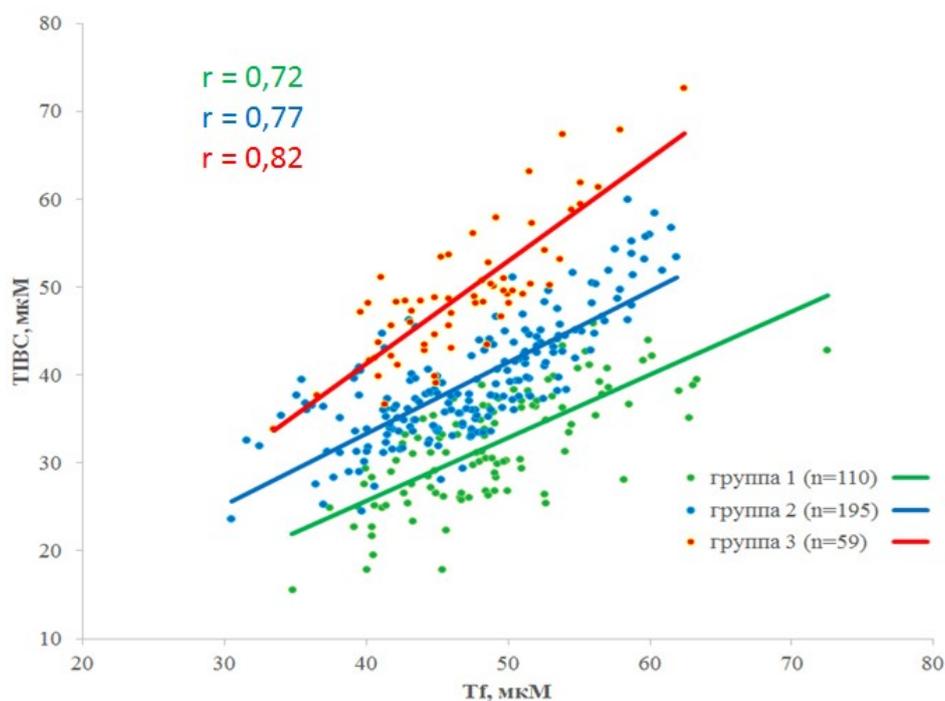


Рисунок 3. Диаграмма рассеяния ТIBC на концентрации Tf

Таблица 3. Уравнения одномерной линейной регрессии насыщения Tf железом (Fe/Tf) и отношения концентрации железа к ТИВС (Fe/ТИВС) с учетом стандартной ошибки в группе 1 (здоровые доноры), группе 2 (компенсированный сахарный диабет) и группе 3 (некомпенсированный сахарный диабет)

Группа	Уравнение	Уровень значимости коэффициентов
1 (N=110)	$Fe/ТИВС = (0,397 \pm 0,009) \times (Fe/Tf) + (0,134 \pm 0,007)$	p=0,000
2 (N=195)	$Fe/ТИВС = (0,687 \pm 0,019) \times (Fe/Tf) + (0,065 \pm 0,010)$	p=0,000
3 (N=59)	$Fe/ТИВС = (0,969 \pm 0,040) \times (Fe/Tf)$	p=0,000
Примечание: уровни значимости при сопоставлении параметров уравнения регрессии $p_{12}=0,000$, $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,000$.		

Наиболее интересно наблюдение, что у всех трех групп выявлена отрицательная корреляция между долей HbA1c и удельной активностью трансферрина (ТИВС/Tf) (рис. 4), насыщение Tf ионами железа снижается по мере усугубления гипергликемии. Обращают на себя внимание слабые, но значимые корреляционные связи, которые были выявлены только у условно здоровых доноров: связь концентрации HDL и ферроксидазной активности Ср ($r=0,31$), ферроксидазной активности Ср и концентрации Tf ($r=0,19$). Положительную корреляцию между ферроксидазной активностью Ср и концентрацией Tf можно объяснить регуляцией, опосредованной доступностью железа для тканей, которая в свою очередь определяется ферментативной активностью Ср. На уровне транскрипции экспрессия гена Tf усиливается при дефиците железа [McKnight, et al., 1980], однако избыток железа в клетках уменьшает синтез TfR на уровне трансляции и таким образом может снижаться захват Tf клетками и увеличиваться его концентрация в плазме крови. Отсутствие корреляции между концентрацией HDL и ферроксидазной активностью Ср у пациентов с СД2 может объясняться недавним исследованием, в котором было показано, что модифицированные при гликировании Ср, Tf и HDL быстрее элиминируются *in vivo* из кровотока пациентов [Kasumov, et al., 2018].

Между концентрацией Fe и Tf была выявлена сильная отрицательная связь у условно здоровых доноров ($r=-0,55$), которая снизилась у пациентов с компенсированным СД2 ($r=-0,16$) и изменила направление на положительную корреляцию у пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,35$), $p_{12}=0,0006$, $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,000$ (рис. 5).

Отрицательная корреляция между концентрацией Fe и Tf у здоровых доноров хорошо согласуется с данными об усилении экспрессии гена Tf в печени на уровне трансляции при дефиците железа [McKnight, et al., 1980]. Известно, что дефицит железа вызывает стабилизацию транскрипционного фактора HIF-1 α , который связывается вместе с HIF-1 β с промотором гена Tf и усиливает транскрипцию его мРНК [Rolfs, et al., 1997]. Для эффективной активации транскрипции комплекс HIF взаимодействует с фактором трансаактивации p300, однако при модификации глюкозой и метилглиоксалем данное взаимодействие разобщается [Botusan, et al., 2008];

Thangarajah, et al., 2010]. Вероятно, нарушение механизма HIF-зависимой регуляции экспрессии гена Tf может объяснять изменение направления связей между концентрацией Fe и Tf по мере усиления гипергликемии при СД2.

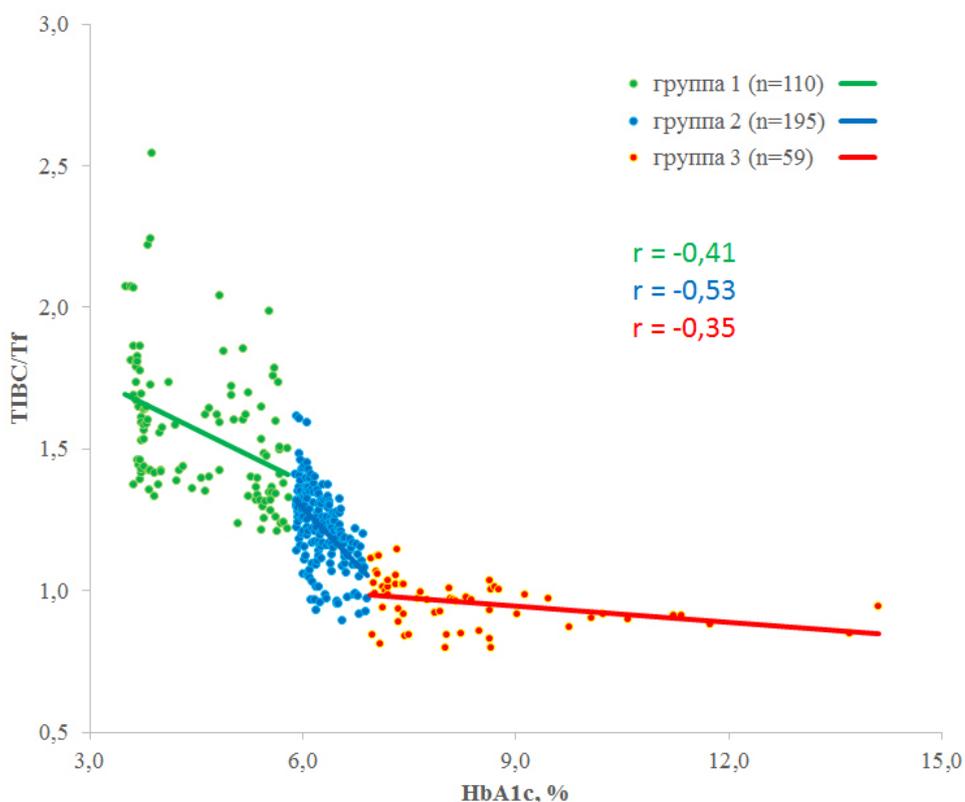


Рисунок 4. Диаграмма рассеяния удельной активности Tf (ТИБС/Тf) на доле HbA1c

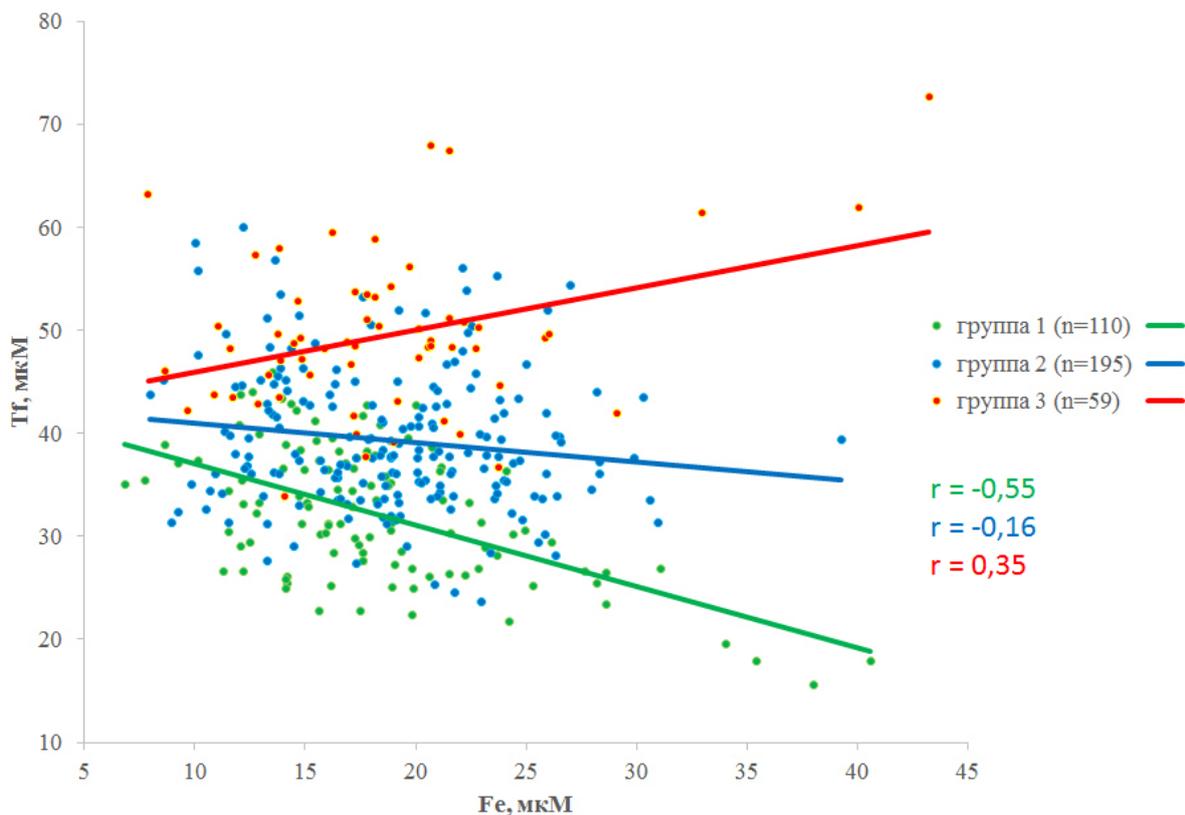


Рисунок 5. Диаграмма рассеяния концентрации Tf на концентрации Fe

Гликирование церулоплазмينا и трансферрина *in vitro*. Стерильный препарат очищенного Ср (конечная концентрация 3 мкМ) инкубировали в течение 7 дней в присутствии различных концентраций глюкозы (0-30 мМ) при 37°C, в качестве контроля проводили инкубацию образцов такого же состава при 4°C. Время инкубации соответствовало периоду полувыведения Ср из циркуляции. На рисунке 6 представлены результаты определения активности Ср в отношении р-PD, ферроксидазной активности (FerOx) и концентрации фруктозамина в пробах, которые инкубировали при 37°C. Как р-PD-активность Ср, так и его ферроксидазная активность снизились в 4 раза в результате недели инкубации при 37°C с максимальной концентрацией глюкозы (30 мМ) (рис. 6), при этом концентрация фруктозамина, которая характеризует степень ковалентной модификации белка при гликировании, увеличилась в 4 раза. Для визуализации изменений оксидазной активности Ср после гликирования пробы были подвергнуты диск-электрофорезу в ПААГ без детергентов, а затем было проведено окрашивание полиакриламидного геля с помощью о-дианизидина – специфического хромогенного субстрата Ср (рис. 7).

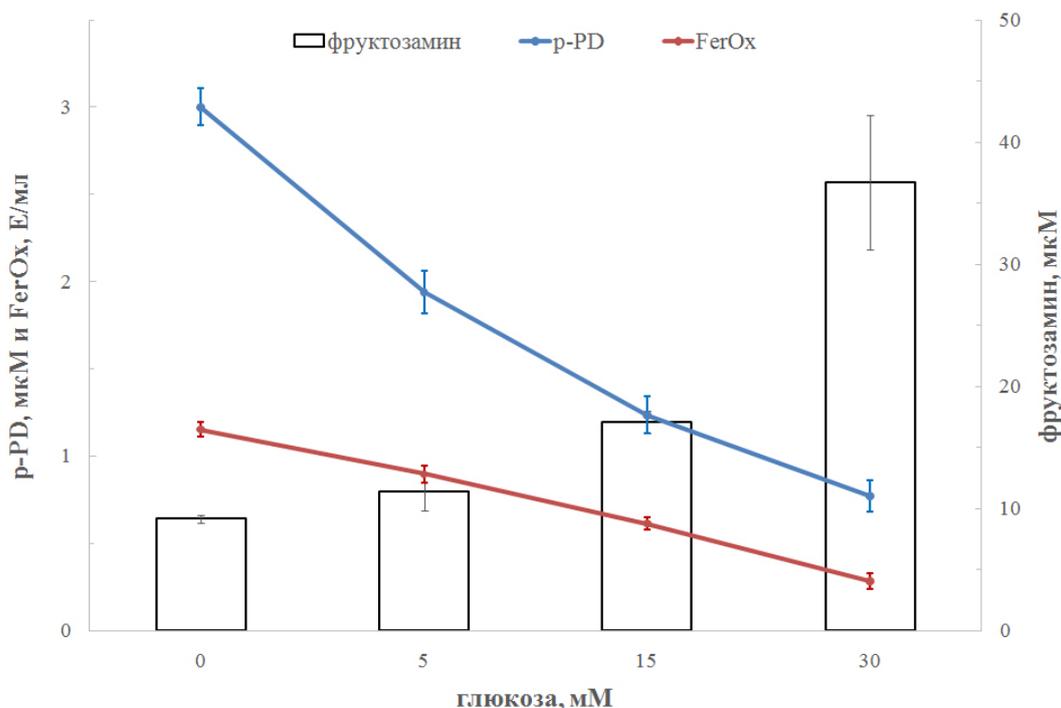


Рисунок 6. Активность препаратов 3 мкМ Ср в отношении р-PD, ферроксидазная активность (FerOx) и концентрация фруктозамина после 7 дней инкубации при 37°C в присутствии 0-30 мМ глюкозы, данные представлены в виде среднего значения и доверительного интервала ($\alpha=0,05$)

Аналогичные опыты были проведены с использованием стерильного препарата очищенного Tf, однако время инкубации было увеличено до 2 недель, что соответствовало периоду полувыведения Tf из плазмы крови. Однако способность 51,3 мкМ Tf к связыванию железа не изменилась вне зависимости от температуры (4°C либо 37°C) и концентрации глюкозы (0-30 мМ). Снижение железо-связывающей способности Tf было зафиксировано ранее при инкубации проб сыворотки крови и очищенного препарата Tf, однако для этих целей была использована концентрация глюкозы – 1 М [Fujimoto, et al., 1995], что в 33 раза превышает

использованную нами концентрацию.

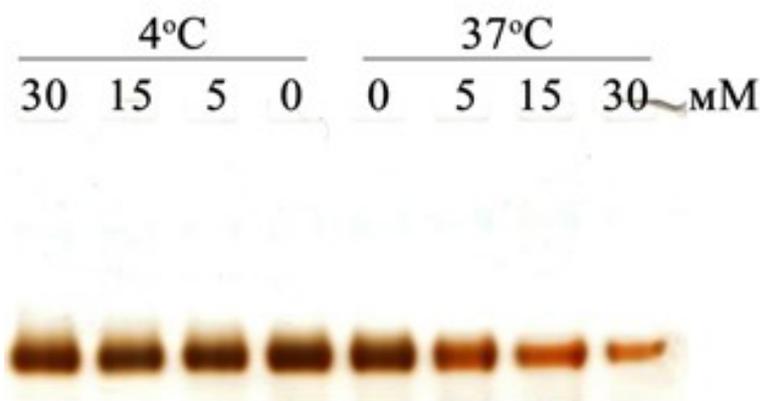


Рисунок 7. Электрофореграмма после окрашивания о-дианизидином полиакриламидного геля после диск-электрофореза без детергентов проб, содержавших различные концентрации глюкозы (0-30 мМ) и 3 мкМ церулоплазмينا, которые инкубировали при температурах 4°C и 37°C в течение 7 дней

Исследование взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина

Тесная функциональная связь Ср и Tf, а также прочное взаимодействие Ср с Lf, который является катионным гомологом Tf, явились предпосылками для более подробного исследования принципиальной возможности взаимодействия Ср и Tf. Для исследования принципиальной возможности взаимодействия Ср и Tf был выбран метод поверхностного плазмонного резонанса. На рисунке 8 представлены типичные сенсограммы, полученные при пропускании над поверхностью чипа растворов Tf и Lf в диапазоне 1,6-51,3 мкМ, приготовленных на буфере, ионная сила и pH которого совпадает с плазмой крови в норме. В случае Tf ответ сенсора в течение 50 секунд промывки буфером без белка снижался практически до 0 RU (рис. 8, а), а в случае Lf на этом же временном промежутке сохранялось около половины ответа сенсора, достигнутого в момент максимального насыщения поверхности – около 54-59 сот начала инъекции (рис. 8, б).

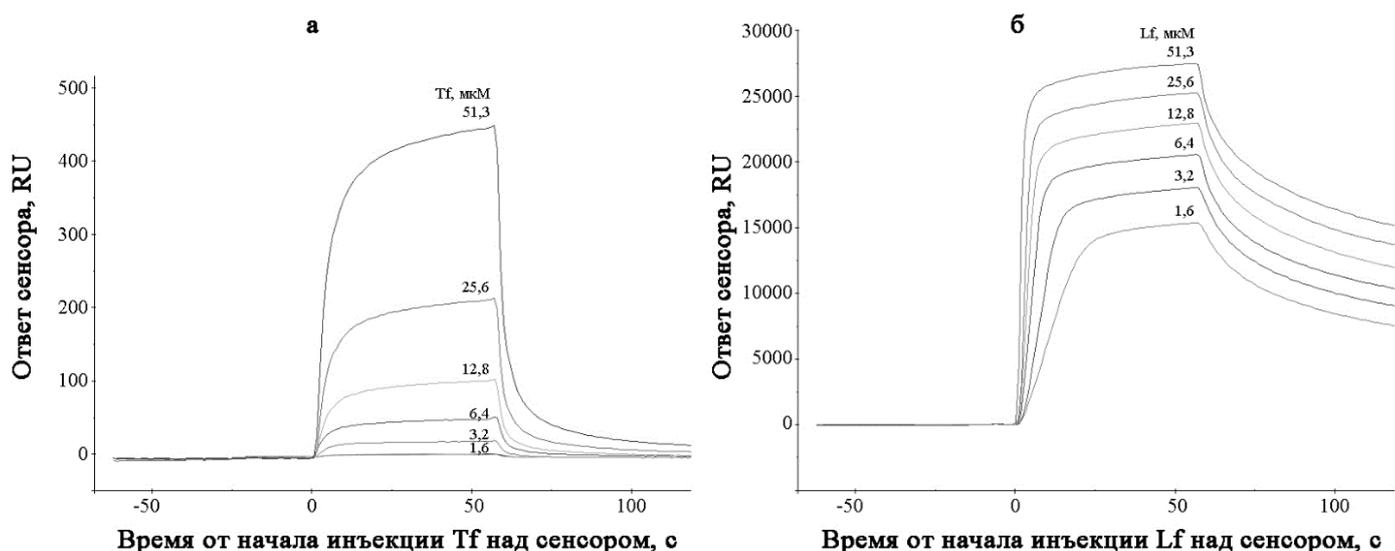


Рисунок 8. Серия сенсограмм, характеризующих взаимодействие (а) апо-формы Tf и (б) апо-формы Lf с поверхностью сенсора с иммобилизованным Ср: до 0 с сенсор уравнивали буфером, в течение 60 с инъецировали 1,6-51,3 мкМ растворы белков, а затем буфер

На основании кривых связывания и диссоциации Tf и Lf с поверхностью сенсора с иммобилизованным Cr были рассчитаны кинетические параметры взаимодействия белков (табл. 4). Полученное значение константы диссоциации комплекса Cr-Tf как минимум в 24 раза превышает физиологическую концентрацию Tf. При сравнении взаимодействия Cr-Tf с эталонным взаимодействием Cr-Lf следует отметить, что второй комплекс формируется примерно на 2 порядка быстрее (отношение значений k_a около 79) и диссоциирует примерно на порядок медленнее (отношение значений k_d около 14). Для исследования принципиальной возможности взаимодействия Cr и Tf нами был также использован метод равновесной гель-фильтрации, однако он не показал образования комплекса между Cr и Tf.

Таблица 4. Кинетические параметры взаимодействия апо-формы Tf (апо-формы Lf) и Cr, иммобилизованным на поверхности CM5-чипа, согласно модели связывания 1:1. Данные представлены в виде $Xm \pm SE$.

Аналит	k_a , 1/M×с	k_d , 1/с	R_{max} , 10^3RU	K_D , мкМ	U-значение
Tf	130 ± 10	$0,157 \pm 0,007$	$8,30 \pm 0,68$	1206	15
Lf	10250 ± 290	$0,0109 \pm 0,0003$	$23,53 \pm 0,26$	1,07	4

k_a – константа скорости ассоциации,
 k_d – константа скорости диссоциации,
 K_D – равновесная константа диссоциации,
 R_{max} – максимальная связывающая способность поверхности сенсора

На основании проведенных опытов можно заключить, что, несмотря на тесную функциональную связь Cr и Tf, а также ряд публикаций, посвященных обнаружению взаимодействия между Cr и Tf с помощью методов флуоресцентной спектроскопии [Ha-Doong, et al., 2010; Eid, et al., 2014], мы не можем согласиться с тем, что данные белки формируют прочный комплекс, поскольку даже на равновесной стадии SPR-анализа мы не наблюдали существенного связывания Cr и Tf.

Анализ изменений метаболизма железа у крыс при индуцированной стрептозотоцином гипергликемии. С помощью аналитических методов были изучены некоторые биохимические параметры, характеризующие обмен железа, в сыворотке крови, полученной от крыс контрольной группы и крыс с моделью гипергликемии. В таблице 5 суммированы данные о средних значениях показателей, полученных при выполнении данного исследования. Обнаружено повышение концентрации Cr в группе крыс с моделью гипергликемии, а удельная ферроксидазная и p-PD-оксидазная активности Cr снизились, снизились и концентрации ферритина, Tf. Не было выявлено изменений концентрации Fe и ТПВС, что согласуется с данными, полученными при исследовании этих параметров у условно здоровых доноров и пациентов с СД2. Однако удельная активность Tf, охарактеризованная как отношение ТПВС/Tf, не изменилась при моделировании гипергликемии у крыс, а отношение Fe/Tf увеличилось при гипергликемии. Этот результат можно объяснить большими компенсаторными

возможностями антиоксидантных систем, признаком которых, в частности, является выявленное нами увеличение концентрации Ср, которое нивелирует снижение удельной активности Ср, что в свою очередь может компенсировать снижение концентрации Tf.

Не исключено, что обнаруженные разнонаправленные изменения концентрации Ср и Tf могут отражать развитие воспаления, характерного для стрептозотоциновой модели. Недавно было показано, что данное состояние сопровождается увеличением активности фермента нейтрофильных лейкоцитов, миелопероксидазы, которая коррелировала с концентрацией карбониллов в белках [Stocker, et al., 2017].

Таблица 5. Биохимические показатели и значимость их различий в контрольной группе крыс и группе крыс, получивших инъекцию STZ.

Показатель	Ме (Q1 – Q2)		Уровень значимости, р
	Контроль (N=8)	STZ (N=8)	
Гемоглобин (Hb), г/л	123,6 (117,5 – 128,8)	124,7 (120,0 – 132,6)	NS
Глюкоза, мМ	8,3 (7,0 – 9,0)	40,0 (36,1 – 42,5)	0,000
Фруктозамин, мМ	1,0 (0,9 – 1,0)	1,2 (1,2 – 1,3)	0,001
Ферроксидазная активность Ср (FerOx), Е/л	806,8 (715,6 – 872,2)	822,1 (770,0 – 854,4)	NS
Пара-фенилендиамин-оксидазная активность Ср (p-PD), мкМ	7,0 (6,3 – 8,2)	7,3 (6,8 – 8,0)	NS
Церулоплазмин (Ср), мкМ	6,6 (5,9 – 8,0)	8,9 (8,7 – 9,5)	0,001
FerOx/Ср, Е/мкмоль	117,1 (113,7 – 123,2)	9,2 (88,6 – 95,0)	0,000
p-PD/Ср, моль/моль	1,0 (1,0 – 1,1)	0,8 (0,8 – 0,8)	0,000
Железо (Fe), мкМ	39,8 (34,9 – 47,0)	46,3 (44,0 – 52,9)	NS
Общая железосвязывающая способность (ТIBC), мкМ	95,7 (87,3 – 108,1)	85,2 (82,3 – 92,0)	NS
Трансферрин (Tf), мкМ	69,1 (63,1 – 83,0)	53,7 (47,1 – 61,5)	0,0499
ТIBC/Tf, моль/моль	1,2 (1,1 – 1,8)	1,7 (1,4 – 1,9)	NS
Fe/Tf, моль/моль	0,55 (0,46 – 0,68)	0,89 (0,70 – 1,10)	0,015
Ферритин(Ft), нг/мл	19,5 (17,8 – 21,5)	15,5 (14,8 – 16,5)	0,028
Примечание. NS – уровень значимости выше критического уровня, 0,000 – значащая цифра находится дальше 3-го разряда после целого			

На рисунке 9 представлены динамика изменения концентрации глюкозы у крыс контрольных групп и групп получавших Lf по смешанной схеме – доза 250 мг/кг за 5, 3, 1 дней до и через 2, 4, 6 и 8 дней после введения STZ (по 7 крыс в опытной и контрольной группе), и также данные на 35 день после инъекции STZ. На 35 день развития гипергликемии у крыс контрольных групп было зафиксировано достоверное снижение концентрации SH-групп, а у животных, получавших Lf этот эффект был менее выражен (рис. 9). При исследовании активности

глутатионпероксидазы в лизате эритроцитов было выявлено снижение активности фермента на 35 день гипергликемии у крыс контрольных групп, которое нивелировалось при введении животным Lf (Рис. 9). Напротив, активность глутатион-S-трансферазы повышалась на 35-й день гипергликемии у крыс контрольных групп, а у крыс, получавших Lf этот показатель не изменился по сравнению с образцами крови, полученными до введения стрептозотоцина (Рис. 9).

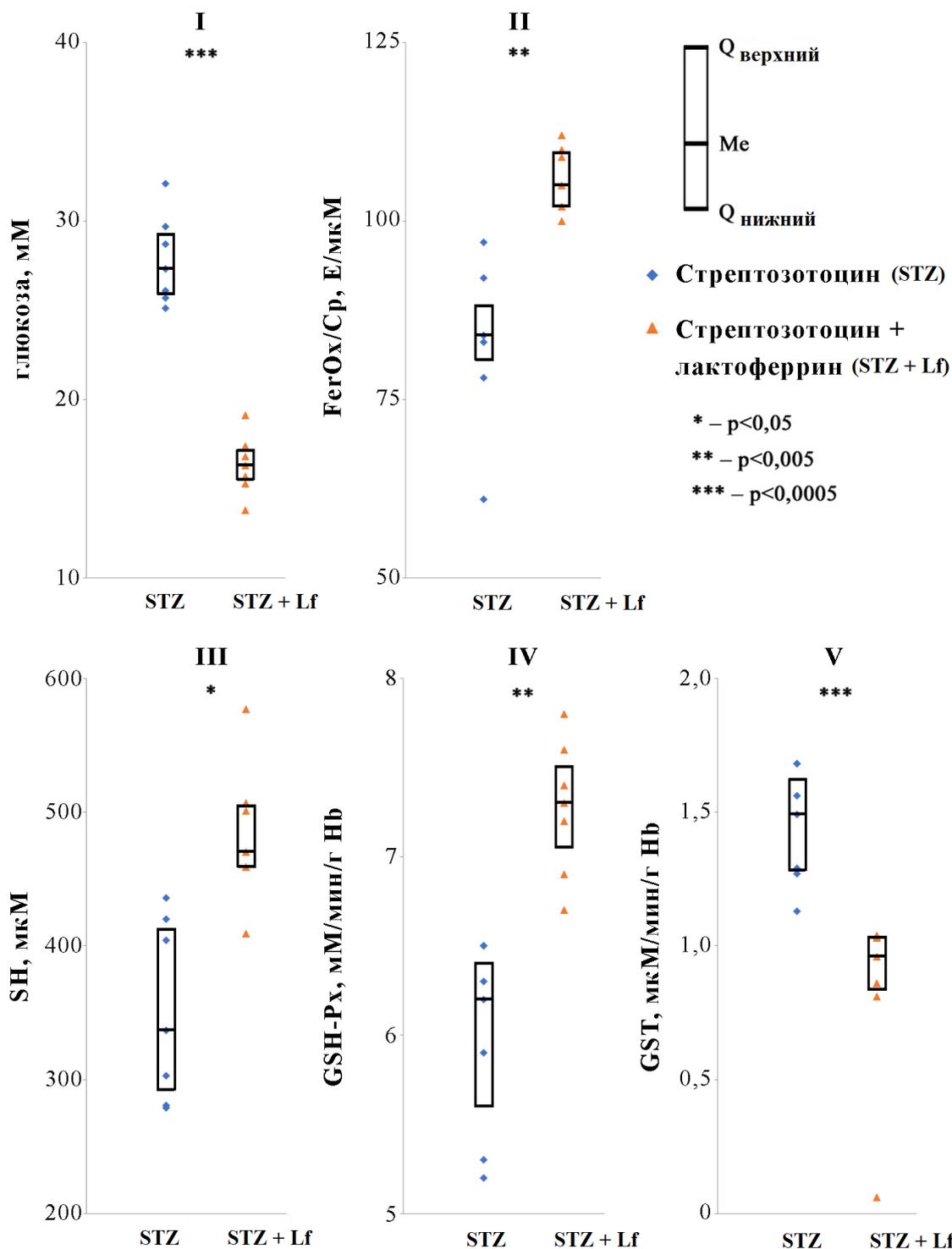


Рисунок 9. Сравнение на 35 день после инъекции STZ концентрации глюкозы (I), удельной ферроксидазной активности Ср (II), концентрации SH-групп (III), активностей глутатионпероксидазы (GSH-Px, IV) и глутатион-S-трансферазы (GST, V) у крыс контрольной группы (STZ) и крыс опытной группы, получавших Lf по смешанной схеме (STZ + Lf). Данные представлены как Q_{верхний}, Me, Q_{нижний}.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании показателей обмена железа в зависимости от степени компенсации гипергликемии у пациентов с СД2 нами было обнаружено достоверное снижение удельной ферроксидазной активности Ср, сопровождавшееся снижением количества атомов меди на молекулу Ср (табл. 1). Эти изменения были подтверждены с помощью регрессионного анализа концентрации ионов меди от концентрации Ср (табл. 2). Отношение ТИВС к Tf и отношение концентрации Fe к Tf, характеризующие удельную способность Tf связывать Fe(III), снижались у пациентов с гипергликемией по сравнению со здоровыми донорами (табл. 1, рис. 2). Эти результаты подтвердились достоверным изменением коэффициентов регрессии в уравнении одномерной линейной регрессии насыщения Tf железом (Fe/Tf) и отношения концентрации железа к ТИВС (Fe/ТИВС) (табл. 3), что позволило выявить изменение железо-связывающей функции Tf при развитии СД2. Мы предположили, что нарушение регуляции экспрессии гена Tf опосредованное гликированием регуляторов HIF-зависимого ответа на железо-дефицит может объяснить изменение связей между Fe и Tf по мере усиления степени гипергликемии (рис. 5). Наблюдения изменения функциональной активности Ср и Tf при гипергликемии в целом подтвердились при моделировании гликирования *in vitro*. Действительно, при гликировании снизилась ферроксидазная активность Ср параллельно с увеличением образования фруктозамина (рис. 6). Сравнительное взаимодействие Ср с Tf и Ср с катионным гомологом Tf, лактоферрином, мы пришли к выводу, что последний образует прочный комплекс с Ср (табл. 4). Учитывая, что Ср и Lf способны образовывать гетерологичные комплексы, в том числе *in vivo*, и более того, в таких комплексах усиливается ферроксидазная активность Ср на заключительном этапе исследований мы изучили влияние STZ-индуцированной гипергликемии на изменение показателей обмена железа у крыс, а также возможность коррекции этого состояния с помощью введения животным рекомбинантного Lf человека. Нами было подтверждено снижение удельной ферроксидазной активности Ср в результате развития гипергликемии у крыс, получивших инъекцию STZ для моделирования гипергликемии (табл. 5). Среди использованных нами трех схем введения Lf, терапевтической (50 мг/кг ежедневно с 1 по 5 день от введения (STZ), профилактической (250 мг/кг за 5 дней до введения STZ) и смешанной (250 мг/кг за 5, 3, 1 дней до и через 2, 4, 6 и 8 дней после введения STZ), последняя оказалась наиболее эффективной и результаты опосредованного Lf коррекции гипергликемии, снижения ферроксидазной активности Ср и концентрации SH-групп (рис. 9) свидетельствуют в пользу того, что лактоферрин может быть перспективным антигликемическим препаратом. Помимо перечисленных показателей Lf корректировал и изменения антиоксидантных ферментов, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. В целом выявленные эффекты Lf находятся в соответствии с его способностью регулировать активность HIF-сигнальной системы и активности фактора Nrf2.

ВЫВОДЫ

1. При некомпенсированной хронической гипергликемии церулоплазмин теряет ионы меди, вследствие чего ферроксидазная активность фермента, необходимая для встраивания железа в трансферрин, снижается.

2. Нарушение встраивания железа в трансферрин компенсируется за счет увеличения концентрации трансферрина, что ведет к снижению отношения концентрации железа к трансферрину. Последнее выявляет железodefицит при гипергликемии (латентную анемию).

3. Церулоплазмин и трансферрин не формируют устойчивого комплекса даже в равновесных условиях.

4. Ферроксидазная активность церулоплазмينا снижается при гликировании *in vitro*.

5. Лактоферрин корректирует стрептозотоцин-индуцированную гипергликемию у крыс: нормализует концентрацию глюкозы, активность церулоплазмينا, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ:

1. Сравнение взаимодействия церулоплазмينا с лактоферрином и трансферрином: to bind or not to bind/Соколов А.В., **Войнова И.В.**, Костевич В.А., Власенко А.Ю., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. // Биохимия, – 2017. – Т. 82. – С. 1374-1380. DOI: 10.1134/S0006297917090115

2. Зависимость удельной активности участников обмена железа от степени компенсации сахарного диабета 2-го типа / **Войнова И.В.**, Костевич В.А., Елизарова А.Ю., Карпенко М.Н., Соколов А.В. // Медицинский академический журнал, – 2019. – Т. 19, № 2.– С. 37-42. DOI: 10.17816/MAJ19237-42

3. Анализ концентрации и активности белков, участвующих в обмене железа, у крыс при гипергликемии, индуцированной стрептозотоцином / **Войнова И.В.**, Костевич В.А., Елизарова А.Ю., Карпенко М.Н., Соколов А.В. // Медицинский академический журнал, – 2019. – Т. 19, № 4.– С. 93-102. DOI: 10.17816/MAJ19088

Статья в журнале, входящем в международные базы Scopus и Web of Science:

4. . Erythropoietin and Nrf2: key factors in the neuroprotection provided by apo-lactoferrin / Zakharova E.T., Sokolov A.V., Pavlichenko N.N., Kostevich V.A., Abdurasulova I.N., Chechushkov A.V., **Voynova I.V.**, Elizarova A.Yu., Kolmakov N.N., Bass M.G., Semak I.V., Budevich A.I., Kozhin P.M., Zenkov N.K., Klimenko V.M., Kirik O.V., Korzhevskii D.E., Menshchikova E.B., Vasilyev V.B. // Biometals, – 2018. – V. 31. – P. 425-443. DOI: 10.1007/s10534-018-0111-9

Тезисы докладов:

5. Анализ активности участников метаболизма железа, церулоплазмينا и трансферрина, в зависимости от уровня гликированного гемоглобина HbA1c /**Войнова И.В.**, Костевич В.А., Власенко А.Ю., Соколов А.В., Васильев В.Б. // сборник тезисов VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека» – г. Санкт-Петербург, Россия. – 3-5 декабря 2015. – С. 28-29.

6. Зависимость активности участников метаболизма железа, церулоплазмينا и трансферрина, от уровня гликированного гемоглобина HbA1c /**Войнова И.В.**, Костевич В.А., Власенко А.Ю., Соколов А.В. // сборник тезисов Научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА – г. Москва, Россия. – 19-20 апреля 2016 г.– С. 43-44.

7. Анализ активности участников метаболизма железа, церулоплазмينا и трансферрина, в

зависимости от уровня гликированного гемоглобина HbA1c / **Войнова И.В.**, Костевич В.А., Власенко А.Ю., Соколов А.В., Васильев В.Б. // сборник тезисов III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» – г. Санкт-Петербург, Россия. – 12-14 сентября 2016. – С. 206.

8. Взаимодействие церулоплазмينا и трансферринов / Соколов А.В., **Войнова И.В.**, Костевич В.А., Власенко А.Ю., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. // сборник тезисов докладов II Международной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» – г. Минск. Беларусь. – 19-20 октября 2017. – С. 136-137.

9. Comparison of interaction between ceruloplasmin and lactoferrin/transferrin: to bind or not to bind / Sokolov A., Kostevich V.A., Vlasenko A., **Voynova I.**, Zakharova E., Vasilyev V. // XIII International Conference on Lactoferrin: Structure, Function & Applications – Rome, Italy. – 5-10 November 2017. – P. 26.

10. Влияние сывороточного альбумина человека на ферроксидазную активность церулоплазмينا / Костевич В.А., **Войнова И.В.**, Елизарова А.Ю., Соколов А.В. // сборник тезисов XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» – г. Санкт-Петербург, Россия. – 14 апреля 2018. – С. 209-210.

11. Альбумин проявляет антиоксидантные свойства и усиливает ферроксидазную активность церулоплазмينا / Костевич В.А., **Войнова И.В.**, Соколов А.В. // сборник тезисов II Белорусского биохимического конгресса. Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии – г. Гродно, Беларусь. – 17-18 мая 2018. – С. 279-281.

12. Анализ корреляционных связей участников метаболизма железа, церулоплазмينا и трансферрина, в зависимости от уровня гликированного гемоглобина HbA1c / **Войнова И.В.**, Костевич В.А., Елизарова А.Ю., Соколов А.В. // сборник тезисов XXII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье». – г. Санкт-Петербург, Россия. – 20 апреля 2019 года. – С. 116-117.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

diBr-PAESA – 3,5-дибромо-2-пиридилазо-N-этил-N-сульфопропиланилин
 Cp – церулоплазмин
 GSH-Px – глутатионпероксидаза
 GSH-ST – глутатион-S-трансфераза
 HEPES – N,N-бис(2-гидроксиэтил-2-аминоэтансульфоновая) кислота
 HIF – гипоксия-индуцибельный фактор
 HDL – липопротеины высокой плотности
 HFE – белок наследственного гемохроматоза
 NAMP – гепцидин
 Hp – гефестин
 HbA1c – гемоглобин A1c
 IgG – иммуноглобулин G
 LDL – липопротеины низкой плотности
 Lf – лактоферрин

Nitro-PAPS – 2-(5-нитро-2-пиридалазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенол
 p-PD (п-ФД) – пара-фенилендиамин
 SDS – додецилсульфатат натрия
 SLC40A1 – ферропортин
 SPR – поверхностный плазмонный резонанс
 STZ – стрептозотцин
 RU – резонансная единица
 Tf – трансферрин
 TfR – рецептор трансферрина
 СД2 (ИНЗСД) – инсулиннезависимый сахарный диабет
 ПААГ – полиакриламидный гель
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 СРБ – С-реактивный белок
 ЭФ – электрофоретическое разделение