

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ВОЙНОВА
Ирина Витальевна

«Особенности параметров метаболизма железа при хронической гипергликемии»

1.5.4 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Соколов Алексей Викторович

Санкт-Петербург – 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Метаболизм железа	10
1.1.1 Пути поступления железа в организм	12
1.1.2 Трансферрин-опосредованное поглощение железа клетками	14
1.1.3 Трансферрин-независимое поглощение железа клетками	15
1.1.4 Внутриклеточный транспорт железа и его экспорт	16
1.1.5 Запасание железа	18
1.1.6 Включение железа в белки клеток. Биосинтез гема гемоглобина	19
1.1.7 Реутилизация железа	20
1.1.8 Регуляция метаболизма железа в организме.....	20
1.1.8.1 Регуляции метаболизма железа на уровне транскрипции. Роль гепцидина ..	21
1.1.8.2 Регуляция метаболизма железа на уровне трансляции.....	27
1.1.9 Структура и функции внеклеточных участников метаболизма железа	30
1.1.9.1 Структура и функции трансферрина	30
1.1.9.2 Структура и функции церулоплазмينا	32
1.1.9.3 Белок-белковое взаимодействие церулоплазмينا и трансферрина	34
1.1.9.4 Структура и функции лактоферрина	35
1.2 Инсулиннезависимый сахарный диабет.....	36
1.2.1 Генетическая предрасположенность к инсулиннезависимому сахарному диабету	38
1.2.2 Патогенез инсулиннезависимого сахарного диабета.....	39
1.2.3 Гипергликемия при инсулиннезависимом сахарном диабете.....	42
1.2.4 Окислительный стресс и инсулиннезависимый сахарный диабет	45
1.2.5 Гликированный гемоглобин как биохимический маркер оценки степени выраженности сахарного диабета	46
1.3 Связь метаболизма железа и инсулиннезависимого сахарного диабета.....	48
1.4 Протективный потенциал Lf при гипергликемии	51
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
2.1 Аналитические методы	56
2.1.1 Фотометрические методы.....	56
2.1.1.1 Определение п-фенилендиаминоксидазной активности церулоплазмينا	56
2.1.1.2 Определение ферроксидазной активности церулоплазмينا.....	56
2.1.1.3 Определение концентрации железа в сыворотке крови	57
2.1.1.4 Определение железосвязывающей способности трансферрина.....	58

2.1.1.5	Определение концентрации трансферрина иммунотурбидиметрическим методом.....	58
2.1.1.6	Определение концентрации гемоглобина в крови унифицированным колориметрическим методом	59
2.1.1.7	Определение концентрации С-реактивного белка иммунотурбидиметрическим методом.....	60
2.1.1.8	Определение процентной доли гемоглобина А1с в цельной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	61
2.1.1.9	Определение степени гликирования белков.....	61
2.1.1.10	Определение концентрации HDL-холестерина	62
2.1.1.11	Определение концентрации LDL-холестерина	63
2.1.1.12	Определение концентрации меди в сыворотке крови	65
2.1.1.13	Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови	65
2.1.1.14	Определение концентрации свободных SH-групп.....	66
2.1.1.15	Определение активности глутатионпероксидазы	67
2.1.1.16	Определение активности глутатион-S-трансферазы	69
2.1.2	Электрофоретические методы.....	70
2.1.2.1	Электрофоретическое разделение нативных белков в щелочной системе....	70
2.1.2.2	Электрофорез в щелочной системе в присутствии додецилсульфата натрия	71
2.1.2.3	Выявление оксидазной активности церулоплазмينا после электрофореза..	72
2.1.3	Иммунохимические методы	73
2.1.3.1	Определение концентрации церулоплазмينا методом ракетного иммуноэлектрофореза	73
2.1.3.2	Определение концентрации церулоплазмينا методом радиальной иммунодиффузии по Манчини.....	74
2.1.3.3	Определение концентрации ферритина, церулоплазмينا и трансферрина крысы методом твердофазного иммуноферментного анализа	75
2.1.4	Определение взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека методом поверхностного плазмонного резонанса	76
2.1.5	Определение взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека методом равновесной гель-фильтрации	78
2.2	Препаративные методы.....	79
2.2.1	Получение сыворотки из цельной крови человека	79
2.2.2	Получение очищенных белковых препаратов	79
2.2.2.1	Выделение ферритина крысы.....	79
2.2.2.2	Выделение церулоплазмينا крысы и человека.....	80

2.2.2.3 Выделение трансферрина крысы и человека	81
2.2.2.4 Выделение лактоферрина человека	82
2.2.3 Получение модифицированных сорбентов.....	82
2.2.3.1 Получение BrCN -активированной агарозы	82
2.2.3.2 Связывание белков с BrCN-активированной агарозной матрицей.....	83
2.2.4 Получение очищенных препаратов антител	83
2.2.4.1 Иммунизация кроликов белковыми антигенами.....	83
2.2.4.2 Выделение фракции иммуноглобулина G из антисыворотки кролика	84
2.2.4.3 Получение специфических антител кролика к белкам крысы	84
2.3 Моделирование	85
2.3.1 Стрептозотоциновая модель гипергликемии у крыс	85
2.3.2 Гликирование церулоплазмينا и трансферрина <i>in vitro</i>	86
2.4. Статистические методы	86
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	88
3.1 Анализ изменений метаболизма железа в зависимости от степени компенсации сахарного диабета 2 типа	88
3.2 Особенности метаболизма железа в зависимости от степени компенсации сахарного диабета 2 типа	91
3.3 Гликирование церулоплазмينا и трансферрина <i>in vitro</i>	107
3.4 Исследование взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина	109
3.5 Анализ изменений метаболизма железа у крыс при индуцированной стрептозотоцином гипергликемии.....	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	123
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129
ПРИЛОЖЕНИЕ	175

ВВЕДЕНИЕ

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 гефестина (*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 ферроксидазной активности мультимедной оксидазы – Ср [Kirsipuu, et al., 2020]. Хотя Ср напрямую не взаимодействует с Tf, его основной физиологической функцией считается ускорение встраивания в Tf железа [Osaki, 1966]. Учитывая, что снижение активности Ср компенсируется ферроксидазной активностью, ассоциированной с липопротеинами низкой плотности (LDL) при наследственных патологиях обмена меди [Topham, 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, церулоплазмينا 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 церулоплазмينا и трансферрина *in vitro*. Препаративные, иммунологические и электрофоретические методы были использованы для выделения и очистки белков крыс и человека. Взаимодействие высокоочищенных препаратов церулоплазмينا, 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 – церулоплазмينا 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 церулоплазмينا, 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 анализов 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».

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Метаболизм железа

Железо (Fe) входит в состав многих белков, где его функциональная роль может быть определена как структурная, каталитическая (перенос электронов), транспортная (связывание кислорода), регуляторная (динитрозильные комплексы железа, гипоксия-индуцибельные факторы). Так, в гемсодержащих белках (гемоглобине и миоглобине) железо входит в состав порфиринового кольца в восстановленной форме и принимает участие в связывании молекулы кислорода [Chiabrando, et al., 2014]. Железо доставляется в костный мозг, чтобы внести свой вклад в ежедневное производство приблизительно 200 миллиардов новых эритроцитов [Lawen, et al., 2013].

В гемсодержащих ферментах (каталазе, цитохром оксидазе, пероксидазе) железо участвует в активации молекулярного кислорода или окислении биомолекул с участием пероксида водорода, в составе белков митохондриальной дыхательной цепи железо участвует в создании разности потенциалов, а, следовательно, в производстве АТФ. В белках, содержащих железосерные кластеры (рубредоксин и ферредоксин), железо участвует в переносе электронов [Мао, et al., 2018]. Динитрозильные комплексы железа являются одной из главных форм оксида азота (NO) [Vanin, 2021], регулирующего тонус сосудов, воспаление и множество процессов в живых системах. Мононуклеарное и динуклеарное негемовое железо в закисной или окисной форме входит в состав многих ферментов: диоксигеназ, гидроксилаз и оксидаз. Так железо в пролин- и аспарагин-гидроксилазах участвует в регуляции стабильности гипоксия-индуцибельных факторов, важнейших регуляторов опухолевого роста и выживания клеток в условиях стресса [Samagni, et al., 2023]. Железо также участвует во множественных ферментативных процессах, катализирующих метаболические процессы такие, как биотрансформация ксенобиотиков, липидный обмен, производство коллагена или синтез ДНК. Например, ионы железа необходимы для репликации ДНК, так как являются ко-факторами рибонуклеотидредуктазы [Gaur, et al., 2021].

Одним из ключевых органов, принимающих участие в метаболизме железа, является печень. Печень синтезирует трансферрин (Tf), отвечающий за транспорт железа в крови; церулоплазмин (Cp), обеспечивавший окисление железа (II), благодаря своей ферроксидазной активности; гепцидин, главный регулятор системной концентрации

железа в организме. Печень – депо железа, где последнее запасается внутри ферритина (Ft), тем самым защищая клетки от токсичности железа.

Индукцированное железом окислительное повреждение макромолекул с помощью активных форм кислорода (АФК), особенно высокореактивного гидроксильного радикала, $\text{OH}\cdot$, образующегося в реакции Фентона, инициирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран [Gaschlera, et al., 2017]. В процессе ПОЛ образуются токсичные побочные продукты [Geçotek, et al., 2019], которые повреждают белки (путем окисления боковых цепей аминокислот, особенно цистеина, образования оснований Шиффа с формированием белок-белковых сшивок, и окисление полипептидных цепей, в результате чего происходит фрагментация белков) и ДНК [Doorn, et al., 2002; Pizzimenti, et al., 2013]. ПОЛ может сопровождаться повреждением плазматических мембран [Pietrangelo, et al., 1990], снижением активности цитохромов [Khan, et al., 2013], повреждением митохондрий.

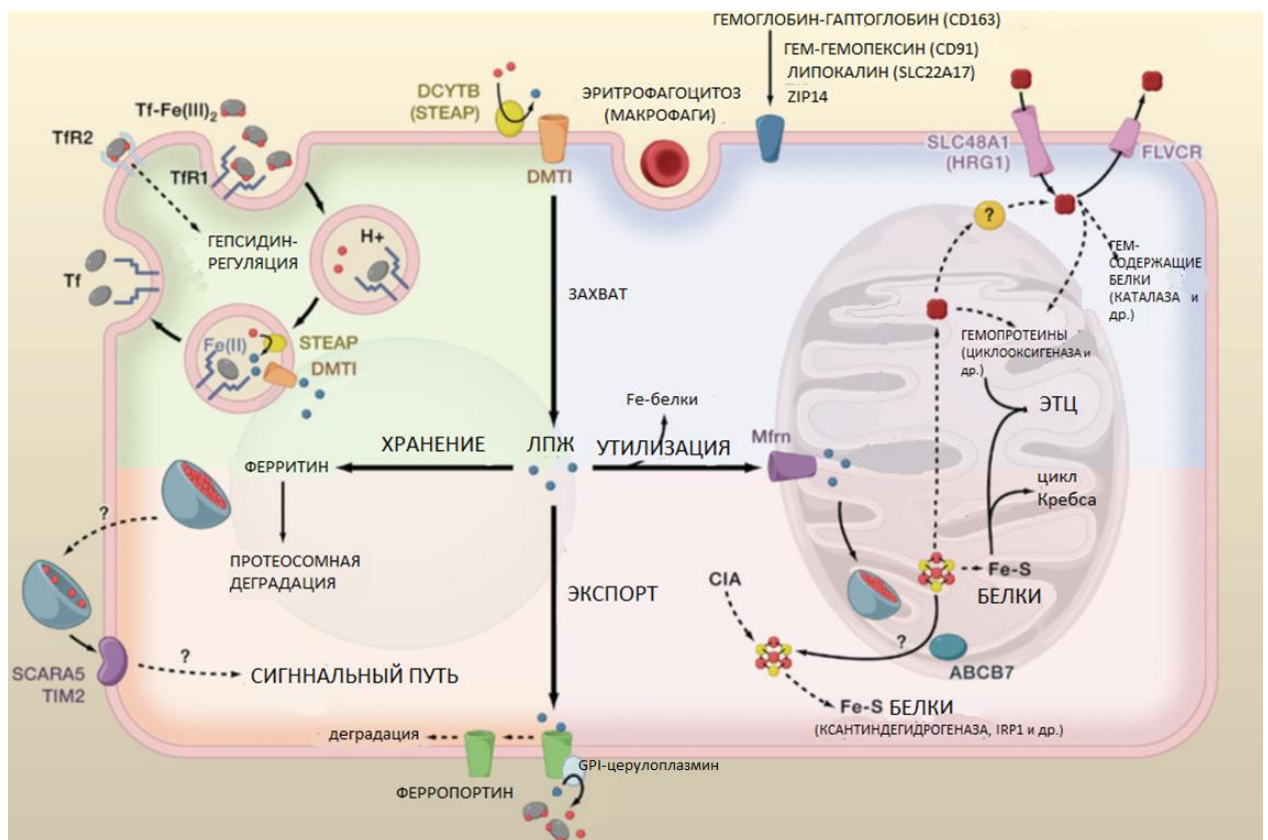


Рисунок 1.1. Клеточная биология метаболизма железа: Fe (II) показано синими сферами, Fe (III) – красными, Fe-S кластеры – розовые и желтые сферы (см. пояснения в тексте)

На Рисунок 1.1. представлена схема обмена железа внутри клеток. Большинство клеток приобретают железо путем эндоцитоза насыщенного железом (III) трансферрина (Tf-Fe(III)₂) в комплексе с рецептором трансферрина 1 (TfR1). В эндосомах железо

высвобождается из комплекса с Tf и восстанавливается до Fe (II) с помощью металлоредуктаз STEAP, и экспортируется в цитозоль через транспортер двухвалентного металла 1 (DMT1); Tf и TfR1 возвращаются в плазматическую мембрану для использования в дальнейших циклах. Поступление железа в апикальную мембрану энтероцита происходит также через DMT1 после восстановления железа ферриредуктазой DcytB.

Другие пути поступления железа в клетку: гемовое железо эритроцитов поступает в макрофаги в комплексе гем-гемопексин, гемоглобин-гаптоглобин. Лабильный пул железа (ЛПЖ) используется для прямого включения в белки железа или транспорта железа в митохондрии через митоферрин, где железо включается в протетические группы гема и железосерных (Fe-S) кластеров. Железо из ЛПЖ может быть экспортировано из клетки через ферропортин, и встроено в Tf, или запасено в нетоксичной форме в Ft. ЛПЖ определяется скоростью поглощения, использования, хранения и экспорта железа; эти процессы должны быть скоординированы, чтобы избежать дефицита железа и предотвратить его избыток.

1.1.1 Пути поступление железа в организм

Общее количество железа в организме взрослого человека обычно составляет от трех до четырех граммов. Нормальная диета обеспечивает 10–20 мг в день, из которых только одна десятая (1-2 мг) поступает извне. Неорганическое железо пищи абсорбируется в апикальной мембране энтероцитов двенадцатиперстной кишки через двухвалентный металлический транспортер 1 (DMT1 /SLC11A2) [Gunshin, et al., 1997; Segarra, et al., 2019]. Содержание железа в цитоплазме энтероцита контролирует активность транспортера DMT1. Учитывая, что железо пищи находится в окисленной форме (Fe³⁺), оно должно быть восстановлено мембраносвязанной ферриредуктазой DcytB (Cybrd1) до Fe²⁺ [Зайчик, и соавт., 2001; Wyman, et al., 2008]. DcytB может быть не единственной ферриредуктазой апикальной мембраны энтероцитов [Lane, et al., 2015]. Гемовое железо поглощается через независимые транспортеры, которые остаются неопределенными [Qiu, et al., 2006]. Гемовое железо утилизируется внутриклеточно, главным образом, индуцируемой гемоксигеназой 1 (Hox1) [Ferris, et al., 1999].

Цитоплазматическое железо экспортируется из клеток базолатеральным экспортером железа ферропортином 1 (IREG 1) [Donovan, et al., 2005; McKie, et al., 2000]. IREG1 – мультидоменный трансмембранный белок, ген которого экспрессируется в энтероцитах, гепатоцитах и макрофагах. В 5'-нетранслируемой области мРНК IREG1

кровоток. Гем, полученный при утилизации гемоглобина, катаболизируется в макрофагах гемоксигеназой-1 (Hox1).

1.1.2 Трансферрин-опосредованное поглощение железа клетками

Железо в свободной форме токсично, для предупреждения токсичности железо связывается с другими молекулами. Попадая в кровоток, Fe^{3+} связывается сывороточным Tf (с образованием комплекса $\text{Fe(III)}_2\text{-Tf}$) и доставляется в органы и ткани, где идет включение железа в состав железосвязывающих белков, а также его запасание. На плазматической мембране клеток находятся рецепторы трансферрина (TfR) [Fisher, et al., 2022]. После связывания TfR с $\text{Fe(III)}_2\text{-Tf}$ на поверхности мембраны клеток происходит интернализация комплекса $\text{Fe(III)}_2\text{-Tf-TfR}$ клатрин-зависимым эндоцитозом, везикулярный транспорт образовавшейся первичной эндосомы и снятие клатриновой оболочки (Рисунок 1.3).

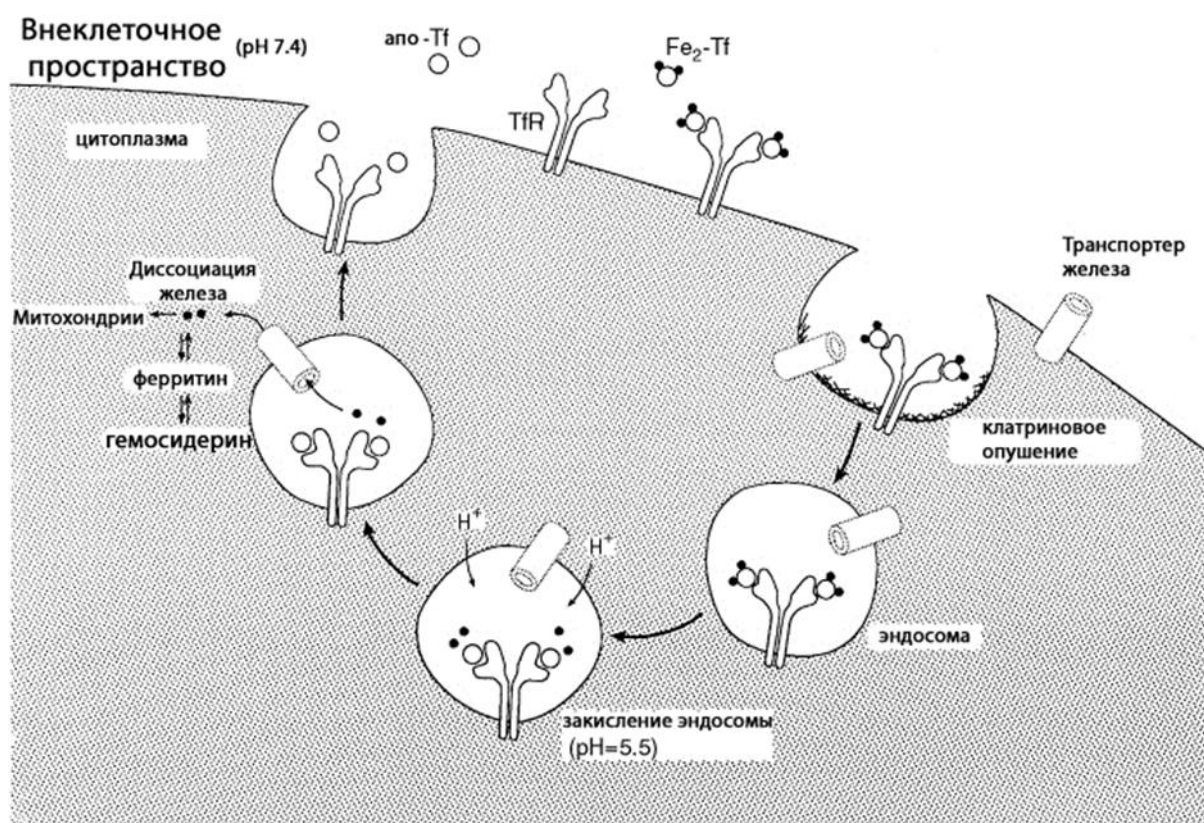


Рисунок 1.3. Клеточный цикл трансферрина (см. пояснения в тексте)

На поверхности плазматической мембраны происходит связывание комплекса $\text{Fe(III)}_2\text{-Tf}$ с рецептором трансферрина (TfR), интернализация и клатрин-опосредованный транспорт $\text{Fe(III)}_2\text{-Tf-TfR}$ с образованием первичной эндосомы, закисление первичной

эндосомы, диссоциация железа и его экспорт из эндосомы в цитоплазму, запасание железа в комплексе с Tf и гемосидерином, возвращение апоTf-TfR на поверхность плазматической мембраны, диссоциация апо-Tf от TfR. Последующее закисление полости первичных эндосом путем встраивания в мембрану H⁺-АТФазы с образованием вторичных эндосом запускает конформационные изменения как Tf, так и TfR [Dautry-Varsat, et al., 1983], которые способствуют освобождению железа из комплекса с Tf. В кислых условиях происходит отделение железа, связанного с Tf: вероятное протонирование карбоната и открытие карманов Tf с высвобождением ионов железа [Bali, et al., 1991]. Оптимальная кинетика цикла Tf важна для эффективного отделения связанного с Tf железа и задействует белковый комплекс экзоциста млекопитающих, который участвует в везикулярном транспорте [Lim, et al., 2005]. Апо-Tf с рецептором возвращаются на поверхность плазматической мембраны. При этом апо-Tf теряет высокое сродство к своему рецептору. При значении pH, характерном для плазмы крови, происходит отделение апо-Tf от TfR [Young, et al., 1981]. В эндосомах происходит восстановление ионов Fe³⁺ до Fe²⁺ членами семейства металлоредуктаз STEAP [Ohgami, et al., 2005; Ohgami, et al., 2006], однако молекулярные механизмы образования ионов двухвалентного железа до конца не выяснены. Двухвалентное железо переносится в цитоплазму транспортером двухвалентных ионов – DMT1, локализованным в мембранах вторичных эндосом и лизосом [Gunshin, et al., 1997]. Таким образом, DMT1 играет двойную роль в метаболизме железа, как апикальный мембранный белок энтероцитов опосредует системное всасывание железа, а также, как повсеместно экспрессирующийся эндосомальный белок, участвует в переносе железа из эндосом в цитозоль.

1.1.3 Трансферрин-независимое поглощение железа клетками

При насыщении Tf более чем на 45% вероятно появление циркулирующего нетрансферрин-связанного железа (NTBI) [Cabantchik, et al., 2022]. В отличие от железа трансферрина к NTBI чувствительны преимущественно гепатоциты [Brissot, et al., 1985; Craven, et al., 1987]. NTBI не является «свободным» железом и связано с низкомолекулярными лигандами (цитрат, ацетат) либо карбоновыми группами альбумина [Hider, et al., 2002].

Биохимические и генетические исследования подтверждают существование и других Tf-независимых путей поглощения железа. *In vitro* показан альтернативный Tf-независимый путь поглощения железа [Gunshin, et al., 2005] через транспортер ZIP14 [Liuzzi, et al., 2006], однако требуется его функциональная проверка *in vivo*. В условиях

системной перегрузки железом кальциевый канал L-типа опосредует Tf-независимое поступление железа в кардиомиоциты [Oudit, et al., 2003]; кальциевые каналы также могут играть роль в доставке железа к нейрональным клеткам [Gaasch, et al., 2007]. Сывороточный Ft может проникать в клетки через ферритиновые рецепторы: Scara5 и TIM-2 [Chen, et al., 2005; Li, et al., 2009]. Наконец, специализированные клетки способны усваивать гемовое железо: SLC48A1 является идентифицированным переносчиком гема [Khan, et al., 2013; Rajagopal, et al., 2008], его природа требует изучения.

Макрофаги рекрутируют гем поврежденных и «стареющих» эритроцитов путем фагоцитоза. В плазме крови гемоглобин и свободный гем, образующиеся в результате внутрисосудистого гемолиза, связываются с различными белками: гемоглобин образует комплекс с гаптоглобином, который доставляется к ретикулоэндотелиальным клеткам посредством CD163-опосредованного эндоцитоза [Thomsen, et al., 2013], свободный гем связывается с гемопексином и их комплекс эндоцитируется через присутствующий рецептор CD91 на поверхности макрофагов, гепатоцитов и др. клеток [Hvidberg, et al., 2005].

1.1.4 Внутриклеточный транспорт железа и его экспорт

Механизм транспорта железа в митохондрии остается малоизученным, однако показано, что у мышей транспорт двухвалентного железа осуществляет недавно выделенный белок внутренней мембраны митохондрий митоферрин 1 (Mfn1 / SLC25A37) [Shaw, et al., 2006]. Этот процесс опосредован ABCB10 – белком, который, как считается, стабилизирует Mfn1 [Chen, et al., 2010]. Потенциально железо может транспортироваться напрямую из эндосом в митохондрии с помощью механизма «поцеловал и убежал» («kiss-and-run») через прямой контакт между обеими органеллами, эффективно обходя цитозоль [Sheftel, et al., 2007].

Экспорт железа происходит в различных клетках, включая нейрональные и эритроидные клетки, но это особенно важно в клетках, которые участвуют в поддержании концентрации железа в плазме – макрофаги, энтероциты и гепатоциты (при эмбриональном развитии – клетки внезародышевой висцеральной энтодермы и плацентарные синцитиотрофобласты) [Donovan, et al., 2005]. В этих клетках имеет место относительно высокая экспрессия *IREG1* [Ward, et al., 2012]. Показано, что целенаправленное разрушение локуса *Slc40a1* (ген *IREG1*) у мыши ведет к редуцированию функции *IREG1* по высвобождению железа из этих типов клеток [Donovan, et al., 2005]. *IREG1* транспортирует Fe (II) из клеток в плазму крови в кооперации с Hp (в энтероцитах)

или Ср (в других типах клеток), которые облегчают освобождение Fe (II) из канала ферропортина, окисляя до Fe (III) и последующее включение в апо-Tf [De Domenico, et al., 2007]. На Рисунок 1.4 представлена топология молекулы IREG1 в мембране, а также сайты связывания с его регуляторами. Ср и Нр являются мультимедными феррооксидазами, что подчеркивает связь обмена меди и железа [Vashchenko, et al., 2013].

В дополнение к опосредованному IREG1 выделению железа, клетки, способны экспортировать железо в форме гема; через FLVCR1 [Keel, et al., 2008; Brings, et al., 2017]. Физиологическая роль экспорта гема остается неясной, но транспортер FLVCR1 является необходимым для дифференцировки проэритробластов и макрофагов у мышей [Keel, et al., 2008]. Эритробласты имеют способность экспортировать избыток гема (например, когда синтез глобина ограничен).

Небольшая фракция железа также может выходить из клеток, связанной с Ft [Truman-Rosentsvit, et al., 2018], механизмы и физиологическая роль высвобождения Ft активно изучаются.

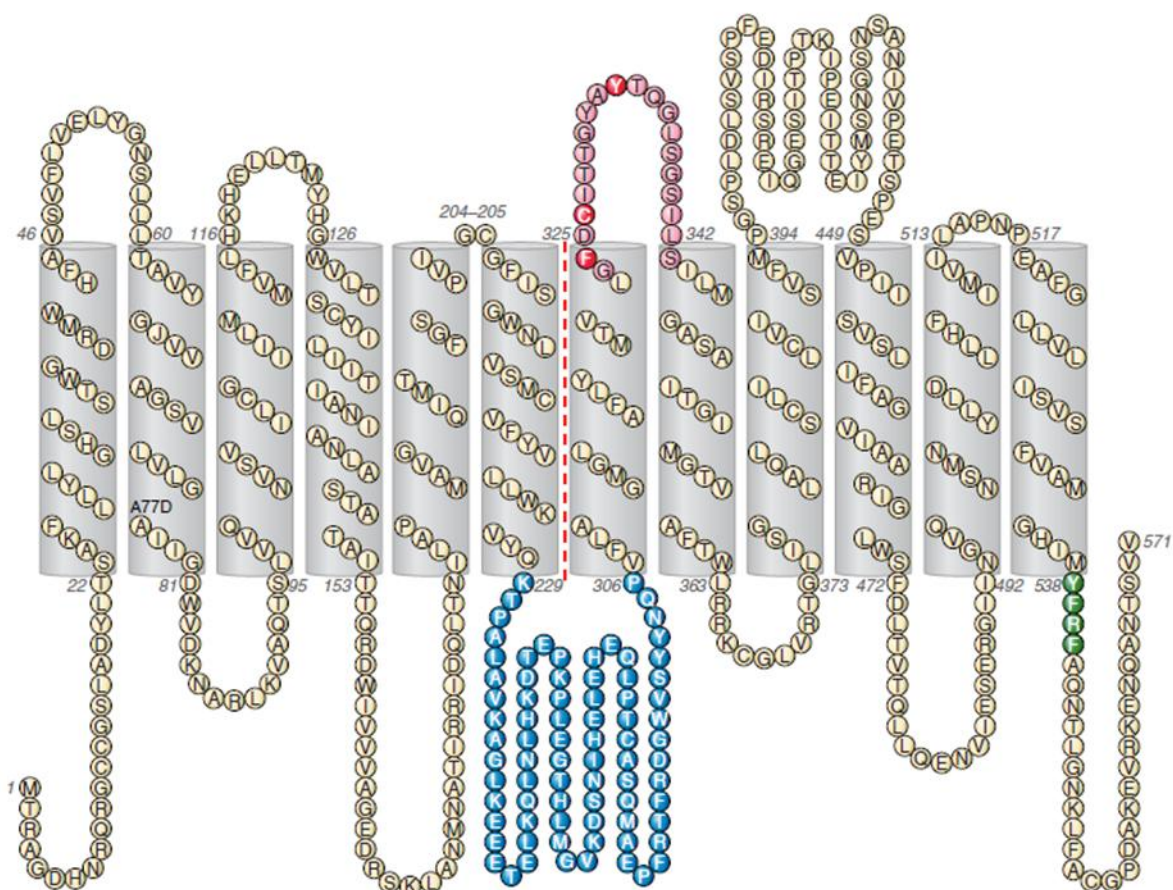


Рисунок 1.4. Топология ферропортина человека и функциональные домены. N- и C-концы находятся в цитоплазме, трансмембранные спирали [Liu, et al., 2005] окрашены серым, внеклеточная гепцидин-связывающая петля – красным; ключевые остатки, необходимые

для связывания гепцидина – темно-красным; цитоплазматическая петля, которая подвергается гепцидин-зависимому убиквитинированию – синим [Qiao, et al., 2012]; мотив для клатрин-зависимого эндоцитоза – зеленым.

1.1.5 Запасание железа

Восстановленное железо запасается в двух формах: в Ft (мобильное железо) и в гемосидерине (немобильная форма). Ферритин (Ft) – цитоплазматический белок гепатоцитов и макрофагов (длина полипептидной цепи 150-190 а.о.) с молекулярной массой около 450-500 кДа, состоящий из H- и L- субъединиц, которые образуются 24-мультисубъединичный комплекс, имеющий участки хранения железа, а также каталитические сайты его окисления [Chasteen, 1998]. Связывание железа происходит в гидратной оболочке белка при участии неорганического фосфата. Ft связывает около 2500-3000 атомов железа на 1 молекулу белка. По мере потребностей организма в железе Ft деградирует в лизосомах и его железо транспортируется к местам синтеза железосодержащих белков [Sibille, et al., 1989]. Гемосидерин – лизосомальный белок гепатоцитов, содержащий большие количества негемового железа, как продукта деградации и агрегации Ft [Ward, et al., 1992]. Как правило, гемосидерин связывает железо в токсических концентрациях, оно выключается из пула мобильного железа.

H- и L- субъединицы Ft экспрессируются повсеместно, но их экспрессия варьируется в зависимости от типа клеток и природы стимула экспрессии, такого как воспаление или инфекция. Тяжелая цепь ферритина (FtH) обладает ферроксидазной активностью, которая необходима для запасания железа [Bakker, et al., 1986; Levi, et al., 1992], в то время как легкая цепь (FtL) облегчает нуклеацию железа и увеличивает число оборотов каталитического центра ферроксидазы в тяжелой цепи Ft [Wang, et al., 2006]. В культуре клеток поли(гС)-РНК-связывающий белок 1 (PCBP1), известный в основном ролью в посттранскрипционной регуляции, требуется для включения железа в Ft [Shi, et al., 2008].

Избыточное митохондриальное поглощение железа (без использования для синтеза гема или включения в железосерные кластеры Fe-S) вызывает накопление железа, поскольку избыточный импорт не сбалансирован экспортом. Такие митохондриальные отложения железа приводят к появлению «кольцевых» сидеробластов (эритробласты с перинуклеарным накоплением железа) [Cazzola, et al., 2003].

1.1.6 Включение железа в белки клеток. Биосинтез гема гемоглобина

В цитоплазме железо присутствует в железо-содержащих белках, таких как рибонуклеотидредуктаза, но большая часть железа попадает в митохондрии, где включается в биоактивный гем и Fe-S кластеры. Биоактивный гем включен в состав белков – гемоглобина, миоглобина, нейроглобина, а также выполняет каталитическую функцию в составе ферментов – пероксидазы и каталазы (детоксикация H_2O_2), цитохрома С (транспорт электронов), нитрооксидсинтазы (генерация NO), цитохром С-оксидазы (терминальный этап окислительного фосфорилирования) [Furuyama, et al., 2007]. Fe-S кластеры включены в состав белков, участвующих в окислительном фосфорилировании (комплексы I-III), клеточном гомеостазе железа (IRP1), пиримидин-пуриновом метаболизме, цикле трикарбоновых кислот (митохондриальная аконитаза), репарации ДНК (NTHL1), синтезе гема (феррохелатаза), синтезе Fe-S кластеров (NBP35, CFD1) [Sheftel, et al., 2010]. Компоненты сборки Fe-S кластеров были обнаружены в цитозоле и могут способствовать синтезу или восстановлению экстрамитохондриального пула Fe-S кластеров [Sheftel, et al., 2010; Tong, et al., 2006].

Гемоглобин (Hb) – гемсодержащий белок эритроцитов, состоящий из соединенных дисульфидными связями 4-х мономеров: два состоят из 141 а.о. – α -цепи, два из 146 а.о. – β -цепи, [Перутц, 1966; Marengo-Rowe, 2006]. Основной функцией Hb является транспорт кислорода от легких к периферическим тканям и углекислого газа из тканей в органы дыхания. Молекула Hb содержит 4 молекулы гема, каждая представляет собой 4 пиррольных кольца, образующих протопорфирин IX, который связывает Fe^{2+} . Увеличение концентрации железа в плазме крови ведет к увеличению концентрации гемоглобина [Elvenjem, 1932].

Синтез гема Hb идет в эритроидных клетках, часть процессов протекает в митохондриях, часть – в цитоплазме [Ajioka, et al., 2006]. Синтез гема начинается в митохондриях с реакции конденсации сукцинил-КоА с глицином с образованием δ -аминолевулиновой кислоты, которая транспортируется в цитоплазму. Здесь происходит синтез 4-х пиррольных колец порфирина, окислительное декарбоксилирование копропорфириногена III с образованием протопорфириногена IX. Последний транспортируется обратно в митохондрии, где происходит окисление его метиленовых групп с образованием протопорфирина IX.

Координируют синтез предшественника гема протопорфирина IX синтаза δ -аминолевулиновой кислоты 2 (ALAS2) [Sadlon, et al., 1999] – специфический для эритробластов фермент синтеза протопорфирина IX, регуляция активности которого

осуществляется железом посттранскрипционно через систему IRE/IRP. Включение Fe^{2+} в состав протопорфирина IX осуществляет митохондриальная феррохелатаза [Hunter, et al., 2011].

1.1.7 Реутилизация железа

Поскольку выведение железа из организма ограничено и осуществляется в небольших количествах путем отслоения эпителиальных клеток кишечника, десквамации кожи, с потом и мочой, при кровопотере, то поглощение железа представляет собой строго контролируемый процесс. Как правило, только 1-2 мг железа в день поглощаются организмом, чтобы компенсировать потери в железе [Hultén, et al., 1995]. Источники накопления железа могут быть энтеральными, как при связанном с дефицитом гепцидина гемохроматозе [Brissot, et al., 2011] или дизеритропозе [Tolosano, 2015], или парентеральными, как при неконтролируемых инъекциях железа при железодефицитной анемии [Fishbane, et al., 2014] или повторных переливаниях [Porter, et al., 2014] при гемоглобинопатиях или миелодиспластическом синдроме. Для обеспечения суточной потребности организма в железе (порядка 20 мг [Ghosh, et al., 2019]) имеет место интенсивный и постоянный процесс реутилизации железа. Выведение железа из циркуляции осуществляют ретикулоэндотелиальные макрофаги, которые поглощают и переваривают стареющие эритроциты. Фагоцитоз эритроцитов включает несколько стадий: поглощение стареющих эритроцитов макрофагами, образование фагосом, деградация глобина и деградация гема (с участием Hox1 и биливердинредуктазы для удаления CO, Fe^{2+} и билирубина) [Maines, et al., 2005; Poss, et al., 1997]. NRAMP1 – белок макрофагов, переносчик двухвалентных металлов гомологичный DMT1, экспрессируется в пределах фаголизосомных мембран и участвует в экспорте железа из фагоцитарных везикул макрофагов [Canonne-Hergaux, et al., 1999; Soe-Lin, et al., 2009]. После высвобождения из гема с участием Hox1 макрофагов Fe^{2+} либо запасается в Ft, либо экспортируется IREG 1 в кровоток. В кровяном русле Ср окисляет Fe^{2+} до Fe^{3+} , которое затем связывается апо-Tf.

1.1.8 Регуляция метаболизма железа в организме

Метаболизм железа сбалансирован двумя регулирующими системами: одна из которых функционирует системно, ее центральными звеньями являются полипептидный гормон гепцидин и экспортер железа IREG1; другая – преимущественно контролирует

клеточный метаболизм железа через железо-регулирующие белки (IRP), которые связывают чувствительные к железу элементы (IRE) в нетранслируемых областях (UTR) РНК [Muckenthaler, et al., 2008].

1.1.8.1 Регуляции метаболизма железа на уровне транскрипции. Роль гепцидина

Гепцидин – пептид семейства дефенсинов, принимающий участие во врожденном иммунитете, признан центральной молекулой системного гомеостаза железа [Verga Falzacappa, et al., 2005].

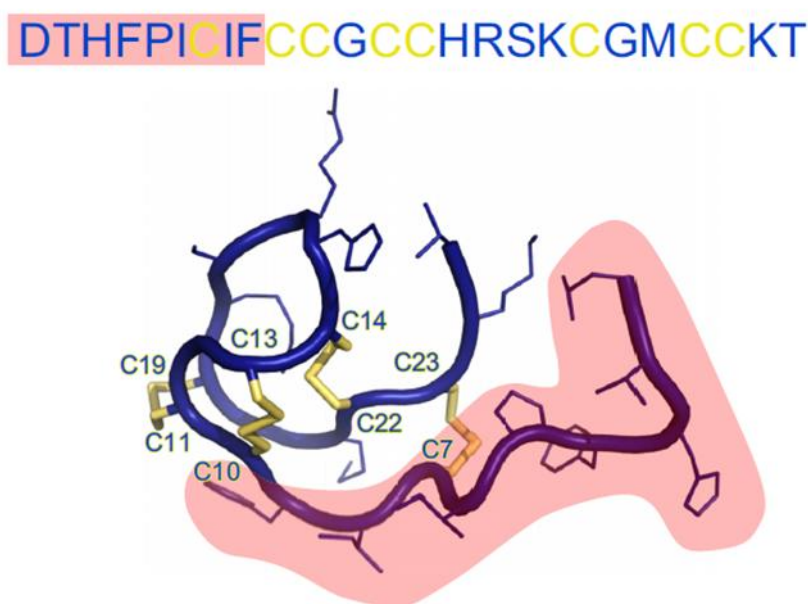


Рисунок 1.5. Аминокислотная последовательность и структура гепцидина. N-концевой сегмент, взаимодействующий с IREG 1, выделен розовым; 4-дисульфидные связи в молекуле гепцидина – желтым

Биоактивный, зрелый пептид (Рисунок 1.5), состоящий из 25 а.о., образуется из препропептида (84 а.о.) путем расщепления фурином [Valore, et al., 2008]. Гепцидин образует шпильчатую структуру с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями [Jordan, et al., 2009]. Гепцидин [Kemna, et al., 2008; Loréal, et al., 2014; Zhao, et al., 2013], выделяется из гепатоцитов и циркулирует в плазме, в связанном с $\alpha 2$ -макроглобулином виде. Очистка от гепцидина происходит путем почечной фильтрации или путем кодеградации с IREG1. Гепцидин уменьшает поступление железа в плазму из энтероцитов и макрофагов, благодаря его воздействию на IREG1. Гепцидин связывается с IREG1 [Preza, et al., 2013], вызывает его интернализацию, убиквитинирование и последующую лизосомальную деградацию [Nemeth, et al., 2004].

Молекулярный каскад реакций для трансдукции сигнала об изменении концентрации железа в плазме крови для регуляции транскрипции гена гепцидина происходит по трем ключевым путям: BMP/SMAD, ERK/ MAPK и JAK-STAT3 (см Рисунок 1.6). Оба пути BMP/SMAD и ERK/MAPK активируются через систему белков HFE-TfR2, что ведет к активации транскрипции гепцидина [Kautz, et al., 2008; Poli, et al., 2010; Calzolari, et al., 2006]. BMP-путь регуляции экспрессии гепцидина задействован ряд белков: комплекс HFE/TfR2, BMP-6 (ключевой белок семейства BMP, который отвечает за изменение экспрессии гепцидина при изменении концентрации железа [Andriopoulos, et al., 2009]), рецепторы BMP (BMPRI/II), гемоювелин (HJV), неогенин.

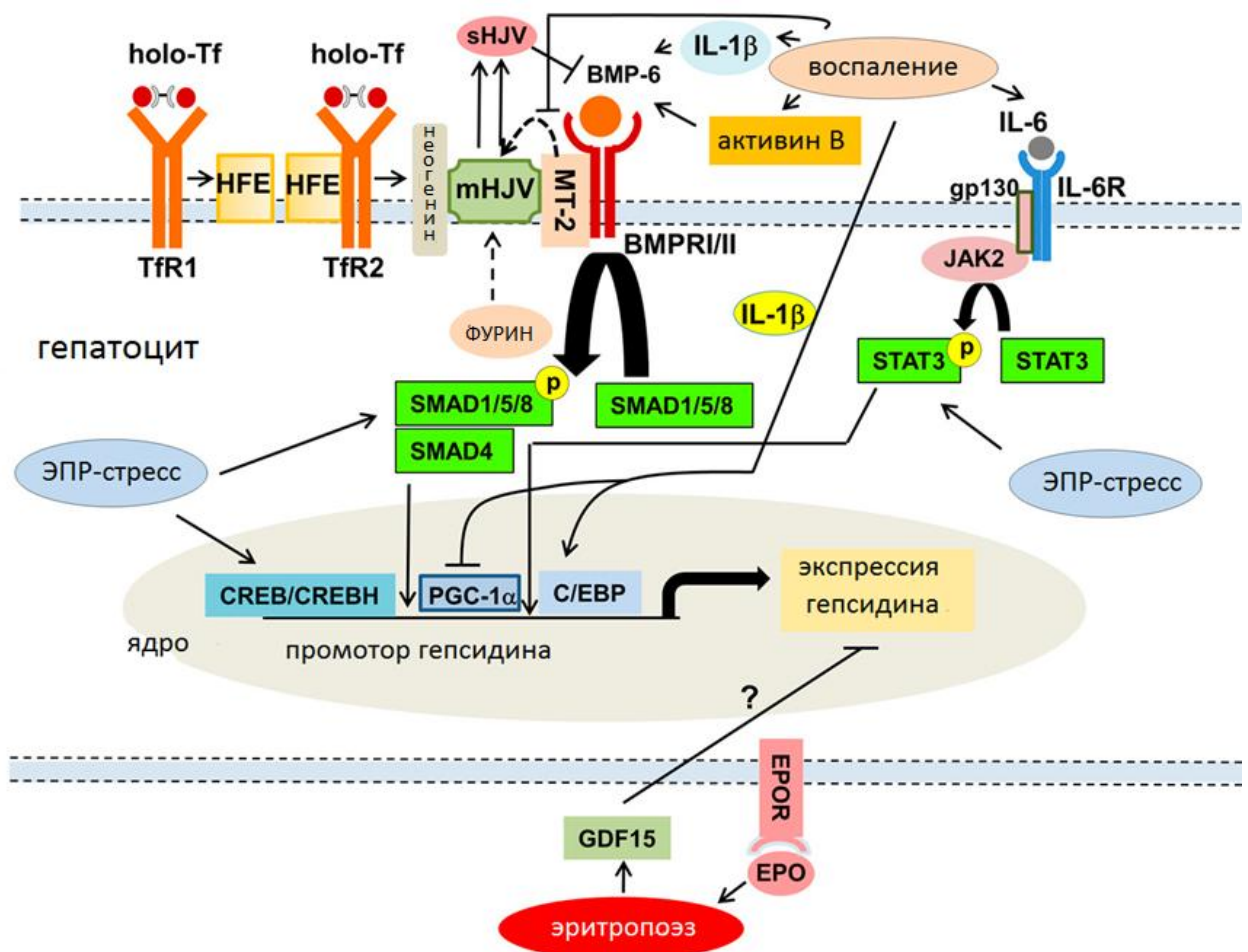


Рисунок 1.6. Регуляция гепцидина: роль железа и воспаления (см. пояснения в тексте)

Мембранный белок HFE имеет структуру, аналогичную белкам MHC класса I, а также связывает $\beta 2$ -микроглобулин [Feder, et al., 1996]. TfR1 связывается с внеклеточными $\alpha 1$ и $\alpha 2$ доменами HFE [Lebrón¹, et al., 1999; Lebrón², et al., 1999; Bennett, et al., 2000; Monteiro, et al., 2022], в то время как TfR2 связывается с регионом между 104 и 250 а.о. и $\alpha 3$ доменом HFE [Chen, et al., 2007]. Предполагается (Рисунок 1.7), что HFE

действует как бимодальный переключатель между двумя сенсорами концентрации загруженного железом Tf – TfR1 и TfR2 на плазматической мембране гепатоцитов [Goswami, et al., 2006].

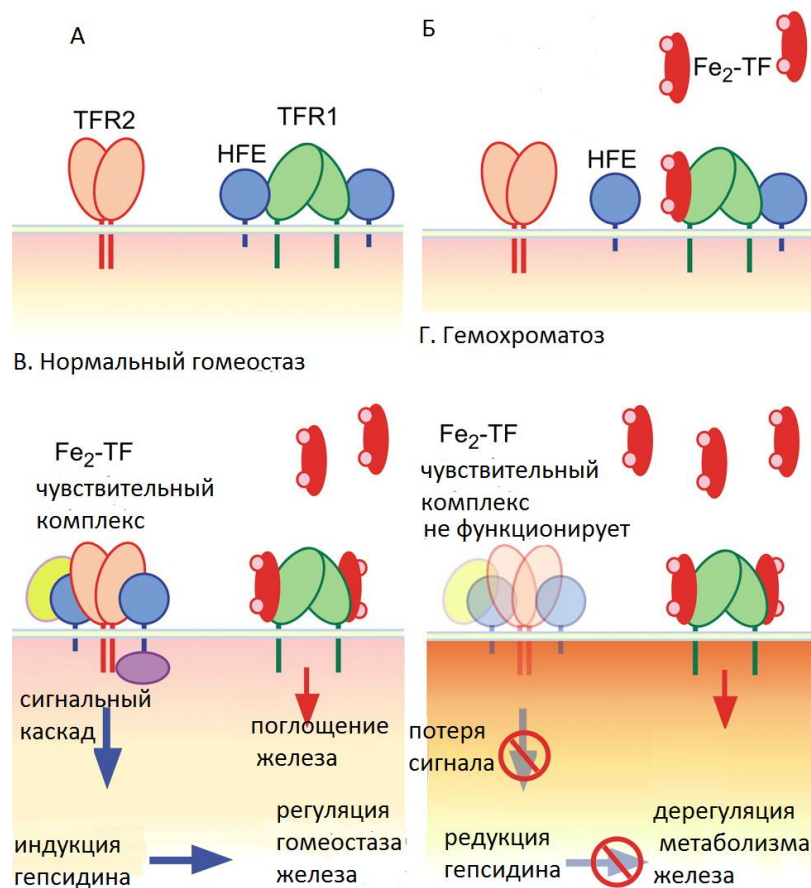


Рисунок 1.7. Модель действия комплекса HFE-TfR2 (см. пояснения в тексте)

В соответствии с данной моделью HFE, как бимодального переключателя, HFE связывает повсеместно выраженный TfR1 в участке, который перекрывает домен связывания TfR1 и Tf, и, таким образом, HFE конкурирует с Tf за связывание с TfR1 [Goswami, et al., 2006]. TfR2 (в отличие от TfR1) может связывать HFE и Tf одновременно [Gao, et al., 2009]. Высокие концентрации Tf-Fe₂ вытесняют HFE из TfR1, что способствует его более интенсивному взаимодействию с TfR2.

Комплекс HFE-TfR2 связывает белок HJV с формированием мультибелкового мембранного комплекса HFE/TfR2/HJV [D'Alessio, et al., 2012]. HJV представляет собой гликофосфатидилинозитол-связанный белок, который экспрессируется в основном в печени, скелетных мышцах и сердце [Malyszko, 2009]. HJV является корецептором BMP [Babitt, et al., 2006; Malyszko, 2009]. Помимо мутаций самого гена гепсидина, только мутации гена *HJV* приводят к почти полному отсутствию экспрессии гепсидина и наиболее тяжелым формам наследственного гемохроматоза [Santos, et al., 2012]. Таким образом, HJV является одним из ключевых белков, регулирующих экспрессию гепсидина.

Гемоювелин (HJV) взаимодействует с рецептором BMP (BMPR) на плазматической мембране для индукции фосфорилирования SMAD белков (R-SMAD) и последующего формирования активных транскрипционных комплексов SMAD4.

Экспрессия *BMP6* активируется при увеличении концентрации железа [Kautz, et al., 2011]. У *bmp6*-нокаутных мышей проявляется дефицит гепцидина и избыток железа в тканях [Andriopoulos, et al., 2009; Meynard, et al., 2009]. Комплекс BMP/HJV присоединяется к BMP рецепторам типа I (Alk2 и Alk3), которые являясь серин-треониновыми киназами фосфорилируют BMP рецепторы типа II (ACTRIIA и BMPRII) [Xia, et al., 2008], что в свою очередь ведет к фосфорилированию и активации белков SMAD. Фосфорилирование SMAD ведет к транслокации данных транскрипционных факторов в ядро и активации транскрипции гепцидина через комплексы, включающие фактор co-SMAD, SMAD4 [Wang, et al., 2005]. Два последовательных мотива (проксимальный BMP-RE1 и дистальный BMP-RE2) в промоторе гепцидина имеют решающее значение для активации транскрипции через путь HJV-BMP6-SMAD4 [Casanovas, et al., 2009; Truksa, et al., 2009]. Формированию комплекса HJV/BMP/BMPR способствует белок неогенин [Zhao, et al., 2016]. Снижение концентрации железа уменьшает синтез BMP-6 и облегчает взаимодействие HFE-TfR1, приводящее к ингибированию BMP/SMAD-зависимой транскрипции гепцидина [Rishi, et al., 2015].

В условиях низкого содержания железа усиливается активность матриптазы 2 (MT-2, TMPRSS6) и фурина, которые расщепляют мембранный HJV (mHJV) [Silvestri¹, et al., 2008; Silvestri², et al., 2008]. TMPRSS6 физически взаимодействует с HJV и вызывает фрагментацию HJV. Предполагается, что HJV является основной целью TMPRSS6 при регуляции железа [Du, et al., 2008; Silvestri², et al., 2008].

Активация транскрипции гепцидина по пути ERK/MAPK [Lawan, et al., 2017] включает каскад реакций, представленных на Рисунок 1.8. Показано, что TfR2 в липидных рафтах плазматических мембран клеток колокализован с белками CD81 и кавеолином-1 и отвечает за активацию ERK1/ERK2 и p38 MAP киназ [Calzolari, et al., 2006]. В экспериментах с выключенными HFE в клетках культуры печени HepG2 и TfR2 у мышей с нокаутом *TfR2*^{-/-} было показано снижение фосфорилирования ERK1/ERK2 киназ и снижение экспрессии гепцидина [Poli, et al., 2010]. Данные, полученные на клетках печени мышей в опытах *in vivo*, демонстрируют, что накопление железа в печени ассоциируется со снижением активации пути MAPK/ERK путем избирательного воздействия на фосфорилирование Erk1/2, при этом передача сигналов Mek1/2-Erk1/2 не связана с индуцированной железом BMP/SMAD экспрессией гепцидина [Tangudu, et al., 2019].

Перекрест между сигнальными путями BMP/SMAD и p38-MAPK активирует экспрессию мРНК гепцидина в ответ на Tf-Fe₂ в мезенхимных стволовых клетках [Lu, et al., 2015].

Экспрессия гепцидина также усиливается стрессом эндоплазматического ретикулума через путь SMAD1/5/8 [Canali², et al., 2016]. Нарушение гомеостаза эндоплазматического ретикулума вызывает синтез транскрипционного фактора CREBH [Swe, et al., 2019], который связывается с промотором гепцидина, или ЭПР-индуцибельного фактора транскрипции CHOP, который через C/EBPα активирует экспрессию гепцидина [Oliveira, et al., 2009].

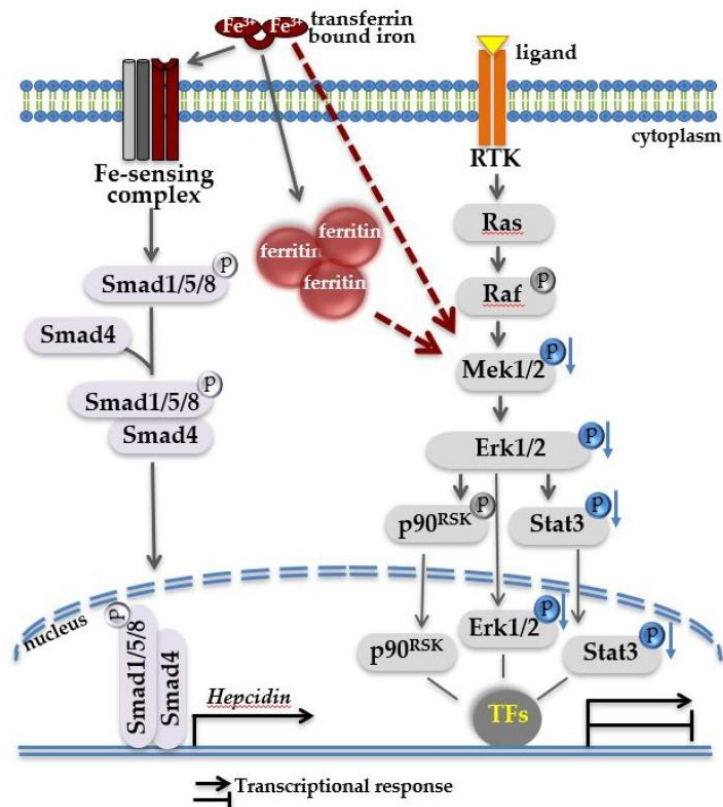


Рисунок 1.8. Активация транскрипции гена гепцидина по ERK/MAPK пути.

Провоспалительные цитокины, такие как IL-1 и IL-6, стимулируют экспрессию гепцидина через JAK-сигнальные пути и активаторы транскрипции STAT3 (Рисунок 1.9) [Fleming, 2007]. Так, провоспалительные цитокины IL-1 и IL-6 являются мощными индукторами экспрессии гепцидина [Lee, et al., 2005]. IL-6 активирует JAK/STAT сигнальный путь, который активирует промотор гепцидина через STAT-связывающий мотив, близкий к стартовому сайту транскрипции [Pietrangelo, et al., 2007].

Воспаление индуцирует другой цитокин, активин В, который стимулирует передачу сигналов через путь BMP/SMAD1/5/8 [Canali¹, et al., 2016].

Воспаление ингибирует экспрессию транскрипционного коактиватора PGC-1, что ведет к усилению экспрессии гепцидина и накоплению железа [Qian, et al., 2013]. Индуцированный воспалением IL-1 β усиливает транскрипцию гепцидина, индуцируя C/EBP [Kanamori, et al., 2017].

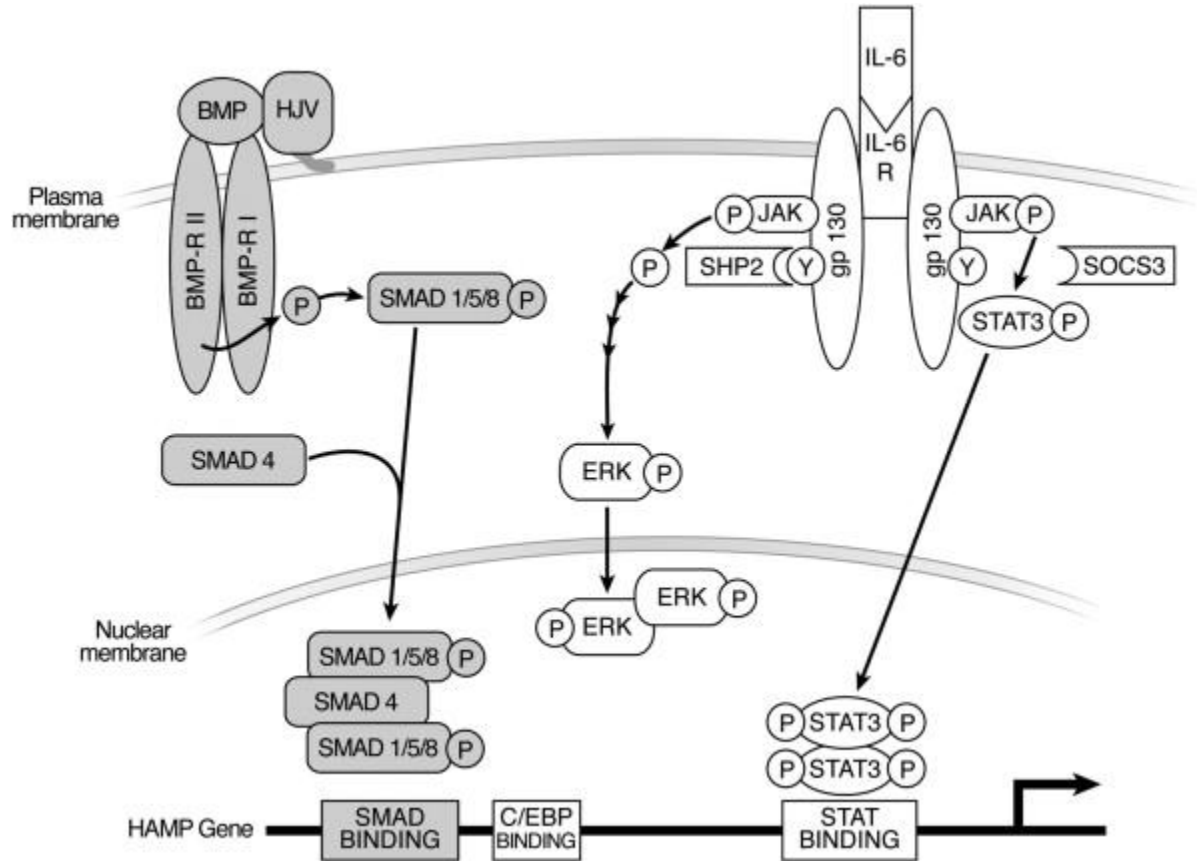


Рисунок 1.9. Регуляция экспрессии гепцидина воспалительными стимулами (см. пояснения в тексте)

Гипоксия также относится к супрессирующим гепцидин факторам [Nicolas, et al., 2002]. HIF-1 и HIF-2 снижают экспрессию гепцидина, а химические стабилизаторы HIF могут подавлять экспрессию мРНК гепцидина в клетках гепатомы [Peyssonaux, et al., 2007]. *In vivo* гипоксия индуцирует синтез эритропоэтина (ЭПО), что в свою очередь стимулирует эритропоэз. Инъекции ЭПО мышам снижают концентрацию гепцидина дозозависимым образом [Pinto, et al., 2008].

Активация экспрессии гена гепцидина регулируется с помощью эритропоэтических сигналов (Рисунок 1.10). Для эритропоэза требуется большое количество железа, таким образом, эритропоэз подавляет экспрессию гепцидина [Pak, et al., 2006]. GDF15 и TWSG 1 синтезируются предшественниками эритроцитов, оказывают свое супрессорное действие через систему BMP/SMAD [Tanno, et al., 2007; Tanno, et al., 2009]. При индукции

эритропоэза эритропоэтином и его рецептором трансляция гепцидина подавляется [Pak, et al., 2006].

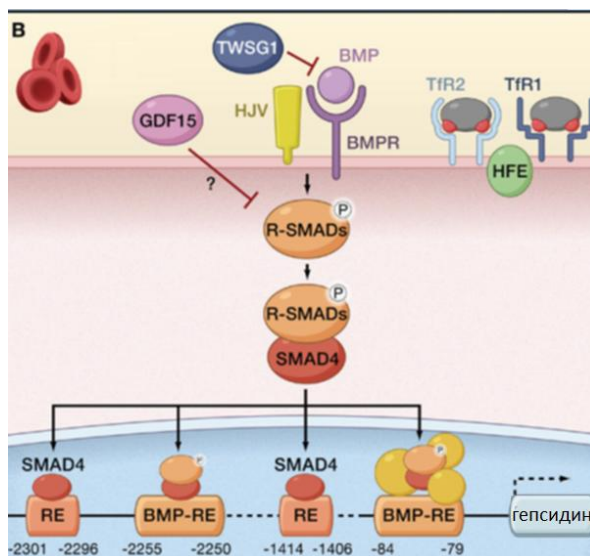


Рисунок 1.10. Регуляция экспрессии гепцидина, опосредованная эритропоэтическими сигналами: GDF15, TWSG1 (см. пояснения в тексте)

1.1.8.2 Регуляция метаболизма железа на уровне трансляции

Поскольку железо входит в состав многих белков и ферментов, принимает участие в реакциях генерации активных форм кислорода, то концентрация железа, а также соотношение окисленного и восстановленного железа требуют строгой регуляции. В то время как ключевые аспекты системного обмена железа регулируются транскрипционно (экспрессия гепцидина) и посттрансляционно (деградация IREG1 гепцидином), клеточный гомеостаз железа координированно регулируется посттранскрипционно железосвязывающими белками IRP1 (90 кДа) и IRP2 (105 кДа) [Pantopoulos, 2004; Garsa, et al., 2020].

IRP1 и IRP2 могут взаимодействовать с консервативными цис-регуляторными шпильчатыми структурами известными как железочувствительные элементы – IRE (Рисунок 1.11), которые присутствуют в 5' или 3' нетранслируемых (UTR) областях мРНК [Piccinelli, et al., 2007]. Железо в комплексе с IRP, вызывает трансформацию, приводящую к диссоциации IRP от IRE, что может способствовать трансляции транскриптов, имеющих IRE в 5'-UTR. После связывания IRP с IRE в 5'-UTR трансляция транскриптов блокируется. Без связывания IRP с 3'-UTR транскрипт может быть чувствителен к атаке и деградации эндонуклеазами, что приводит к подавлению трансляции [Casey, et al., 1988].

Каноническая IRE представляет собой последовательность из 26-30 нуклеотидных пар с консервативным мотивом в апикальной петле CAGUGN (где N = U, C или A) [Thomson, et al., 1999]. IRE в 5'-UTR характерны для мРНК Ft (запасание железа) [Kikinis, et al., 1995], синтазы аминокислоты (синтез гема) [Dandekar, et al., 1991], IREG1 (экспорт железа из клеток) [Abboud, et al., 2000], митохондриальной аконитазы [Kim, et al., 1996] и HIF-2 α [Abboud, et al., 2000; Sanchez, et al., 2007]; IRE в 3'-UTR характерны для мРНК TfR и DMT1 (поглощение железа) [Muckenthaler, et al., 2008; Kato, et al., 2007].

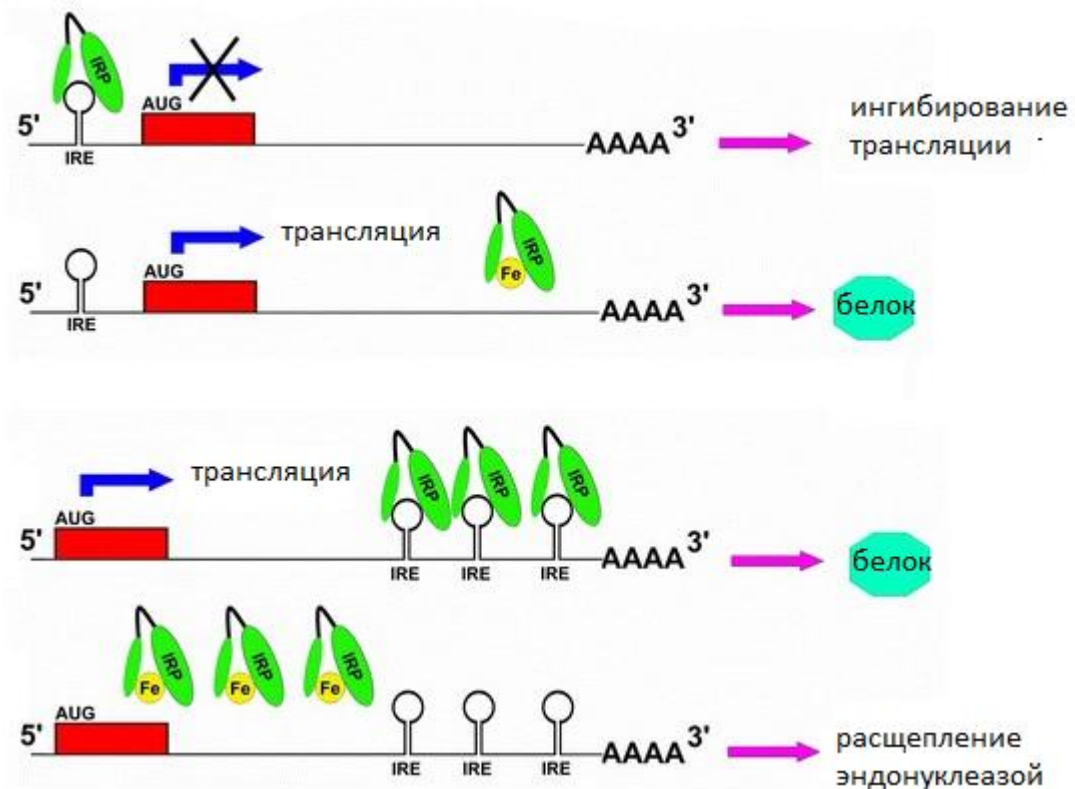


Рисунок 1.11. Механизм модуляции трансляции при взаимодействии IRP и IRE (см. пояснения в тексте)

Изменение РНК-связывающей активности IRP белков зависит от концентрации железа в плазме крови. При увеличении концентрации железа происходит его связывание с белками IRP1 и IRP2 [Kang, et al., 2003; Volz, 2008], при этом IRP1 (но не IRP2) связывает железо в форме кластера 4Fe-4S; включение железа в IRP предотвращает связывание IRP с IRE [Guo, et al., 1994]. IRP1 в связанной с железом форме (4Fe-4S) является аконитазой, относится к семейству гидролаз и катализируют цитоплазматическую реакцию изомеризации цитрата в изоцитрат [Rouault, et al., 1991]. При увеличении концентрации железа в клетках происходит встраивание железа в Fe-S

кластеры аконитазы, при этом усиливается аконитазная активность и уменьшается РНК-связывающая способность этого белка. В такой железосвязывающей форме аконитаза не способна связываться с IRE. В железодефицитных клетках IRP1 теряет Fe-S кластер и связывает IRE в апо-IRP1 конформации.

Аминокислотная последовательность IRP2 на 60% идентична IRP1, однако IRP2 не содержит Fe-S кластеров и не обладает аконитазной активностью [Guo, et al., 1994]. При увеличении концентрации железа в клетках происходит усиление деградации IRP2 в протеосомах за счет усиления убиквитинилирования данного белка [Iwai, et al., 1998].

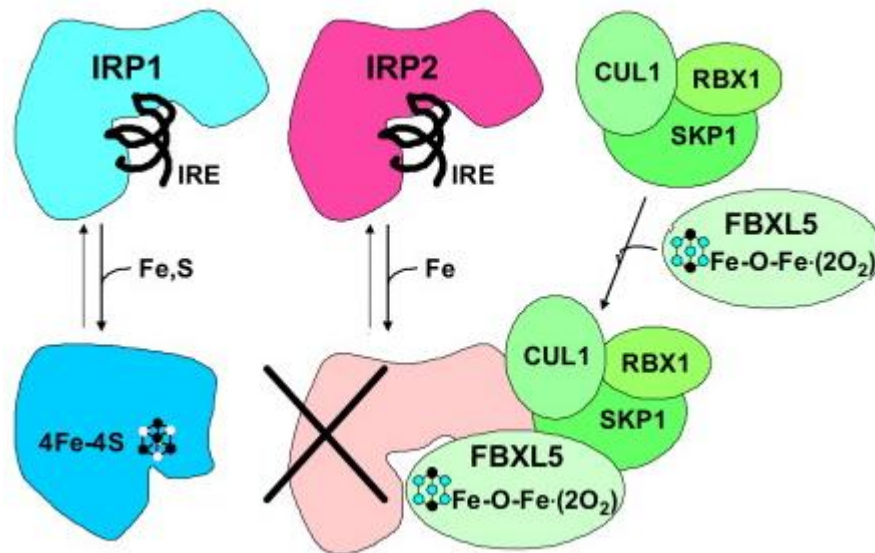


Рисунок 1.12. Механизм регулирования активности IRP убиквитин-лигазным комплексом (см. пояснения в тексте)

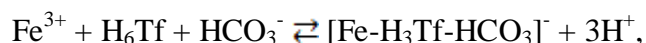
Механизм регуляции активности IRP связан с SKP1-CUL1-FBXL5 убиквитин- E3-лигазным белковым комплексом (Рисунок 1.12). Белок FBXL5 содержит гемэритрин-подобный домен, который при связывании железа стабилизирует FBXL5, предупреждая его протеосомную деградацию [Stenkamp, 1994]; стабилизированный FBXL5 лейцин-богатым участком на С-конце белка связывает апо-форму IRP [Salahudeen, et al., 2009; Vashisht, et al., 2009]. IRP1, в связанной с железом форме, претерпевает конформационные изменения, не позволяющие ему взаимодействовать с FBXL5 [Walden, et al., 2006], в то же время IRP1 в апо-форме подвергается посредством FBXL5 полиубиквитинилированию и последующей деградации [Johnson, et al., 2017]. IRP2 в связанной с железом форме взаимодействует с FBXL5, который рекрутирует SCF (SKP1-CUL1-F-box) лигазный комплекс, способствующий убиквитинированию IRP и последующей протеосомной деградации [Salahudeen, et al., 2009; Wang, et al., 2004].

1.1.9 Структура и функции внеклеточных участников метаболизма железа

1.1.9.1 Структура и функции трансферрина

Tf является основным носителем железа в плазме крови и обеспечивает поступление железа в клетки через TfR [Eckenroth, et al., 2011; Mason, et al., 2009], а также ограничивает образование токсичных радикалов [Baldwin, et al., 1984]. У здорового человека Tf насыщен железом на 30% [Makey, et al., 1976], насыщение Tf менее 16% указывает на дефицит железа, более 45% – признак избыточного накопления железа. Насыщение Tf рассчитывается как процентное отношение концентрации железа к общей железо-связывающей способности сыворотки крови (ТIBC) и служит диагностическим показателем при оценке нарушений обмена железа. Когда насыщение Tf превышает 60%, концентрация циркулирующего не связанного с Tf железа увеличивается [Hider, 2002; Cabantchik, et al., 2022], что ведет к накоплению железа в тканях и может привести к повреждению паренхиматозных клеток.

Tf – железопереносящий белок β -глобулиновой фракции белков плазмы крови, гликопротеин, состоящий из одной полипептидной цепи (698 а.о., 19 а.о. из которых являются сигнальным пептидом) с молекулярной массой приблизительно 77 кДа (без учета гликозилирования) [Gomme, et al., 2005; Jeffrey, et al., 1998; Kurokawa, et al., 1995; Satomi, et al., 2004]. Белок состоит из двух глобулярных доменов N- и C- долей, каждая из которых имеет по два субдомена N1 и N2 и C1 и C2, соответственно [MacGillivray, et al., 1998; Hall, et al., 2002], которые имеют гомологичные участки. Каждая доля имеет один железосвязывающий сайт для связывания одного иона Fe^{3+} [Gomme, et al., 2005; Jeffrey, et al., 1998]. Связывание Tf с Fe^{3+} характеризуется $K_d \sim 10^{-22}$ М [Aisen, et al., 1978]. Для связывания двух ионов Fe^{3+} требуется присутствие двух ионов HCO_3^- (предпочтительно CO_3^{2-}), которые вместе с 4 аминокислотными остатками (два остатка тирозина, один аспарат и один гистидин: Tyr95, Tyr188, Asp63, His249 в N-доле; Tyr426, Tyr517, Asp392 и His585 в C-доле) полипептидной цепи Tf стабилизируют Fe^{3+} в каждом металл-связывающем центре белка [Gelb, et al., 1980; Jeffrey, et al., 1998]:



Следует отметить, что связывание ионов Fe^{3+} в металлсвязывающих центрах Tf возможно при $\text{pH} \sim 7$, а при уменьшении pH комплекс Tf с Fe^{3+} распадается [Campos-Escamilla, et al., 2021]. Такое свойство Tf имеет функциональное значение при связывании Fe^{3+} в плазме крови и разрушении комплекса Fe^{3+} -Tf в эндосомах клетки [Bali, et al., 1991].

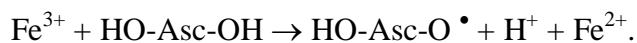
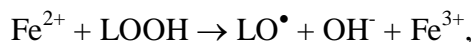
N-Гликозилирование Tf происходит в эндоплазматическом ретикулуме посттрансляционно по остаткам аспарагина. Сывороточный Tf имеет два сайта N-гликозилирования, расположенных в Asn432 и Asn630 (Asn413 и Asn611 в «зрелой» молекуле) в последовательности для N-гликозилирования Asn-X-Ser/Thr [Satomi, et al., 2004], основными гликанами являются N-ацетилглюкозамин, галактоза, остатки сиаловых кислот [Yamashita, et al., 1989]. Около 6% от общего веса белка обусловлено содержанием углеводов.

Ген *Tf* протяженностью 33,5 тысячи пар нуклеотидов локализован на хромосоме 3.q21-q25 и содержит 17 экзонов. Этот регион также кодирует ген трансферринового рецептора [Yang, et al., 1984]. Ген *Tf* экспрессируется главным образом в печени [Zakin, 1992], а также в селезенке [Idzerda, et al., 1986], центральной нервной системе [Espinosa de los Monteros, et al., 1994], половых железах [Chaudhary, et al., 1998]. Количество рецепторов Tf на поверхности клеток тесно связано с уровнем Tf и его насыщением [Thorstensen, et al., 1990].

Основной биологической функцией Tf является участие в метаболизме железа: транспорт железа от мест абсорбции в желудочно-кишечном тракте и деградации гема в ретикулоэндотелиальной системе к местам включения в железосодержащие белки и запасания [Schade, et al., 1946]. Кроме того, связывание Fe^{3+} трансферрином препятствует восстановлению Fe^{3+} до Fe^{2+} для участия в реакции Фентона [Gutteridge, 1986]:



Связывание Fe^{3+} с TF препятствует восстановлению Fe^{3+} до Fe^{2+} в реакциях взаимодействия с семидегидроаскорбатом (HO-Asc-OH) и, тем самым, предупреждает аскорбат-зависимое свободнорадикальное окисление биомембран [Miller, et al., 1989]:



Концентрация Tf в сыворотке крови снижается при воспалении [Baynes, et al., 1986, Matusiewicz, et al., 2017], повышается при аллергических заболеваниях [Jan, et al., 1980], что косвенно подтверждается в других исследованиях [Jan, et al., 2016], в которых развитие анемии коррелировало с развитием аллергических реакций. Насыщение Tf служит прогностическим маркером рисков сердечнососудистых заболеваний [Zacharski, et al., 2017]. Снижение концентрации железа и трансферрина в плазме крови показано при болезни Альцгеймера [Jouini, et al., 2021]. Показано, что при уменьшении концентрации железа в плазме, концентрация Tf увеличивается [Aisen, 1998].

1.1.9.2 Структура и функции церулоплазмينا

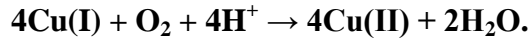
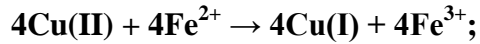
Церулоплазмин (Ср), основная феррооксидаза сыворотки крови [Osaki, et al., 1966], представляет собой гликопротеин, синтезируемый печенью, с молекулярным весом 132 кДа (120 кДа без гликозилирования), состоит из одной полипептидной цепи [Ortel, et al., 1984; Ryden, 1972], содержащей 1065 а.о. (19 из них – сигнальный пептид), и принадлежит семейству мультимедных оксидаз [Vashchenko, et al., 2013]. Молекула Ср может быть разделена на три гомологичных купредоксиновых домена [Ortel, et al., 1984], каждый из которых разделяют на два, таким образом, в первичной структуре Ср можно выделить 6 гомологичных доменов. С молекулой Ср прочно связаны 6 ионов меди и ион кальция, три иона Na^+ [Bento, et al., 2007], имеется лабильный сайт для связывания Fe^{2+} [Lindley, et al., 1997], необходимый для проявления феррооксидазной активности фермента. Ср кодируется одним геном протяженностью в 65 тысяч пар нуклеотидов, ген *Ср* локализован на хромосоме 3.q23-q24 и содержит 20 экзонов [Diamon, et al., 1995].

В эндоплазматическом ретикулуме происходит N-гликозилирование Ср [Takahashi, et al., 1984]. Встраивание в Ср ионов меди в транс-сети аппарата Гольджи осуществляют АТФазы Р1-типа, транспортирующие медь: АТР7А и АТР7В [Barnes, et al., 2005; Bull, et al., 1993], мутации в генах АТФаз ведут к развитию аутосомно-рецессивных заболеваний – болезни Менкеса и болезни Вильсона, соответственно [de Vie, et al., 2007].

Существуют два гомолога Ср и заякоренная изоформа Ср, выполняющие схожие с Ср функции, главным образом вне в плазмы крови. Заякоренная в мембране изоформа Ср находится в цитоплазматической мембране на поверхности клеток центральной нервной системы, формируется путем образования ковалентной связи с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) [Jeong, et al., 2003; Patel, et al., 1997]. GPI-форма Ср образуется в результате альтернативного сплайсинга 19 и 20 экзонов на С-конце мРНК Ср, при этом происходит замена последних 5 а.о. плазматической формы Ср с добавлением 30 альтернативных а.о., которые помечают Ср для заякоривания через GPI [Patel, et al., 2000]. Другой гомолог Ср (трансмембранная форма) – Нр, находится на базолатеральной мембране энтероцита и участвует в окислении Fe^{2+} , проходящего через IREG1 в кровяное русло [Syed, et al., 2002]. Показано, что в иммунных клетках (лимфоциты/моноциты и макрофаги) GPI-форма Ср связана с липидными рафтами и IREG1 [Marques, et al., 2012], а в плазматической мембране эпителия 12-перстной кишки Нр связан с IREG1 [Yeh, et al., 2009]. Наконец, недавно был обнаружен еще один гомолог Ср, циклопен, первоначально идентифицированный в культуре клеток плацентарного происхождения BeWo [Chen, et

al., 2010]. Формирование комплексов IREG1 с гомологами Ср, по-видимому, облегчает транспорт Fe^{2+} , его последующее окисление до Fe^{3+} и встраивание в апо-Тф.

Ключевой физиологической функцией Ср в метаболизме железа (Рисунок 1.13) является его ферроксидазная активность – способность катализировать окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} [Osaki, et al., 1966]:



Катализируя окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} , фермент поддерживает соотношение $\text{Fe}^{2+}:\text{O}_2$ равным 4:1, обеспечивая четырехэлектронный перенос на O_2 с образованием воды, предотвращая неферментативную реакцию, в результате которой образуется $\text{O}_2^{\cdot-}$:

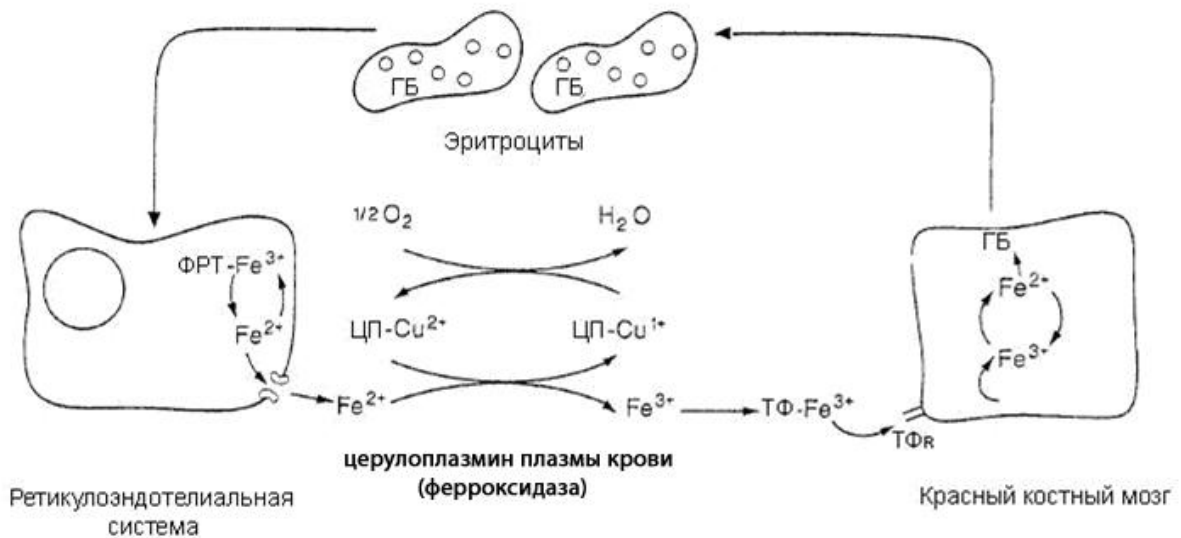
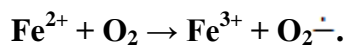


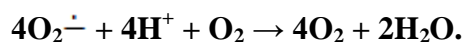
Рисунок 1.13. Участие Ср в метаболизме железа. ЦП – церулоплазмин, ГБ – гемоглобин, TF_R – трансферриновый рецептор, ФРТ – ферритин

Ср препятствует накоплению и действию токсических окисляющих радикалов в плазме крови, поскольку, окисляя Fe^{2+} до Fe^{3+} , Ср может препятствовать реакции Фентона – образованию OH^{\cdot} радикалов при взаимодействии Fe^{2+} с H_2O_2 :



Антиоксидантные свойства Ср лежат в основе его противовоспалительной активности. Из-за быстрого возрастания концентрации Ср в русле крови (в 2-3 раза) уже в начале воспалительной реакции его традиционно относят к белкам «острой фазы» [Gitlin, 1988; Rice, 1961]. По механизму ферроксидазной реакции Ср может осуществлять купроксидазную реакцию, препятствуя токсическому действию прооксидантных ионов

Cu^+ [Stoj, et al., 2003]. Cp играет роль «ловушки» супероксидных анион-радикалов ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [Bannister, et al., 1980]:



Способствуя встраиванию в Ft окисленного Fe^{3+} , Cp ингибирует супероксид- и ферритин-зависимое перекисное окисление липидов [Samokyszyn, et al., 1989]. Показано, что для полноценного встраивания Fe^{3+} в Ft важна не только ферроксидазная активность Cp, но также взаимодействие целостной молекулы Cp с Ft [Juan, et al., 1998].

Обмен железа у человека находится в тесной связи с Cp, подтверждением этому является ацерулоплазминемия – заболевание, вызванное мутацией в гене *Cp*, которая ведет к утрате ферроксидазной активности белка, сопровождается гемосидерозом с обширными отложениями железа в тканях и органах [Touarsa, et al., 2022]. Есть данные, свидетельствующие, что без участия Cp за сутки в Tf встраивается 3–5 мг Fe^{3+} , в то время как в присутствии Cp – 60 мг [Frieden, et al., 1976].

Синтез Cp усиливается в ответ на гипоксию на уровне транскрипции при действии HIF-1, дефицита железа [Mukhopadhyay, et al., 2000], инсулина [Seshadri, et al., 2002]. Cp активизирует гены эритропоэтина, гем-оксигеназы-1, Tf и TfR [Mukhopadhyay, et al., 2000].

1.1.9.3 Белок-белковое взаимодействие церулоплазмينا и трансферрина

Вопрос белок-белкового взаимодействия Cp и Tf является открытым. Физическое взаимодействие между Cp и Tf в стехиометрическом отношении 1:1 было продемонстрировано методом флуоресцентной атомно-эмиссионной спектроскопии [На-Duong, et al., 2010]: показано, что константа диссоциации Cp и апо-Tf составила 19 ± 7 мкМ, при этом константа диссоциации для Cp и другого члена семейства трансферринов – лактоферрина (Lf) составила $1,5 \pm 0,2$ мкМ, что свидетельствует о слабом взаимодействии Cp и Tf по сравнению со взаимодействием Cp и Lf. Кинетика реакции взаимодействия в анаэробных условиях Cp, Tf и Fe^{3+} описана методами химической релаксации и спектрофотометрической детекции [Eid, et al., 2014]: показано, что после окисления в Cp два атома Fe^{3+} переносятся в комплекс $\text{Tf}_2\text{-Cp}$, и что оба атома Fe^{3+} затем перемещаются в С-доли каждой молекулы Tf, что приводит к конформационным изменениям и последующему высвобождению двух молекул моно-насыщенных железом Tf. Косвенные доказательства белок-белкового взаимодействия Cp и Tf получены в условиях гипоксии, когда Cp стимулировал отток железа из макрофагоподобных клеток и встраивание Fe^{3+} в Tf [Sarkar, et al., 2003]. Однако в работе [Hudson, et al., 2008] методами поверхностного

плазмонного резонанса и нативного электрофореза в полиакриламидном геле взаимодействия между Ср и Tf обнаружено не было.

1.1.9.4 Структура и функции лактоферрина

Лактоферрин (Lf) – белок суперсемейства трансферринов, железо-связывающий белок молока [Cheng, et al., 2008; Wang, et al., 2019], входит в состав специфических гранул нейтрофилов [Masson, 1970]. Аналогично трансферрину сыворотки крови состоит из 1 полипептидной цепи (691 а.о., Mr 78 кДа), которая образует две гомологичные доли: N- (1-333) и C-доли (345-361), соединенные между собой α -спиралью (334-344) и нековалентно за счет гидрофобных взаимодействий.

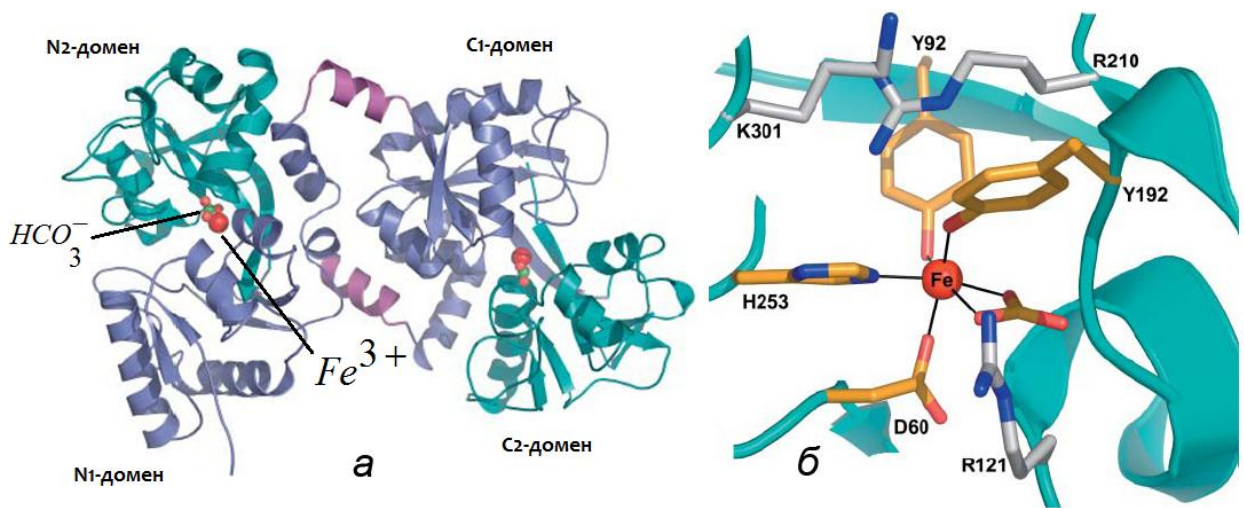


Рисунок 1.14. а) Структура молекулы холо-Lf; б) Строение Fe^{3+} -связывающего сайта в N-доле Lf человека [Baker and Baker, 2005]

Одна молекула апо-Lf прочно связывает два иона Fe^{3+} , образуя холо-форму белка. Связывание происходит в присутствии бикарбонатных ионов в одинаково устроенных связывающих сайтах N- и C-долей. Каждый ион Fe^{3+} взаимодействует с 4-мя а.о. в N-доле (D 61, Y 93, Y 191, H 252) и в C-доле (D 407, Y 447, Y 540, H 609), а также с двумя атомами кислорода карбоксильного аниона (Рисунок 1.14).

Связь ионов железа с белковой частью в Lf человека устойчивее к снижению pH среды, вследствие того, что соединяющий N- и C-доли пептид в Lf принимает конформацию α -спирали, тогда как в Tf этот участок имеет менее упорядоченную структуру.

Ген Lf протяженностью 35 тысяч пар нуклеотидов локализован на хромосоме 3p21.3 [Teng et al., 1987]. В его состав входят 17 экзонов. Для гена Lf характерен полиморфизм, что обеспечивает наличие изоформ Lf [Liu et al., 2002]. Промотор гена Lf содержит элементы, ответственные за экспрессию гена Lf при миелоидной

дифференцировке [Khana-Gupta et al., 2000], и за «сайленсинг» в других клетках [Khana-Gupta et al., 1997].

Ключевыми физиологическими функциями Lf являются обусловленные взаимодействием N-концевого полиаргининового кластера Lf с полианионными молекулами [Brock et al., 1980]: антимикробная (связывание с липидом А в составе липополисахарида (ЛПС) и его нейтрализация [Zhang et al., 1999], с лизоцимом), транскрипционная (связывание с ДНК), прокоагулянтная (связывание с гепарином).

Lf выполняет функцию иммуномодулятора: в ответ на ЛПС осуществляет противовоспалительную инактивацию продукции цитокинов (IL-1 β , IL-8 и TNF- α) моноцитами, ингибирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами [Baveye et al., 2000], снижает проницаемость плазматических мембран клеток [Hu, et al., 2020], подавляет хемотаксис макрофагов [Liu, et al., 2022], увеличивает активность естественных киллеров [Shimizu et al., 1996].

Lf может выступать регулятором поступления железа при железо-дефицитной анемии. Снижая концентрацию IL-6 и прогепцидина Lf значительно снижает как риск выкидыша, так и клинические признаки анемии, включая концентрацию железа в сыворотке и гемоглобина [Paesano, et al., 2014; Lepanto, et al., 2018; Mohamed, et al., 2018; El Amrousy, et al., 2022].

1.2 Инсулиннезависимый сахарный диабет

Инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНЗСД, СД2) – гетерогенная по этиологии и патогенезу группа заболеваний, характеризующихся наследственной предрасположенностью, относительной инсулиновой недостаточностью и инсулинорезистентностью. Причинами инсулинорезистентности и относительной инсулиновой недостаточности являются:

- недостаточный ответ (дисфункция) β -клеток поджелудочной железы на изменение концентрации глюкозы в крови: снижение количества β -клеток в результате апоптоза [Hennige, et al., 2003], снижение секреции инсулина [Saad, et al., 1991], увеличение синтеза проинсулина [Sokooti, et al., 2022] или его протеолиза и др.,

- снижение чувствительности клеток организма к инсулину (инсулинорезистентность) в результате: нарушения синтеза гликогена, как пути утилизации глюкозы [Kelley, et al., 1996; Kruszynska, et al., 1998], нарушения окисления свободных жирных кислот [Dresner, et al., 1999], митохондриальной дисфункции [Chan, et al., 2001], аномалий инсулиновых рецепторов, блокады сигнальных путей инсулина [Hennige, et al., 2003], нарушения транспорта глюкозы [Kashiwagi, et al., 1983] и др..

Самые ранние признаки развития СД2 – снижение секреции инсулина в первой фазе ответа β -клеток на повышение концентрации глюкозы натощак [Lin, 2015], снижение чувствительности тканей к действию инсулина и последующее увеличение базового уровня инсулина и уровня инсулина, стимулированного глюкозой [DeFronzo, 2004].

Дисфункция β -клеток играет важную роль в патогенезе СД2. Повышение уровня глюкозы натощак коррелирует со снижением функции и массы β -клеток [Utzschneider, et al., 2006], что свидетельствует об увеличении рисков развития СД2 задолго до того, как разовьется толерантность к глюкозе и будет поставлен диагноз [Cohrs, et al., 2020]. С другой стороны, дисфункция β -клеток ведет к секреции базового уровня инсулина, не вызванного ответом на стимул - повышением концентрации глюкозы [Peyot, et al., 2010]. Хроническая гиперинсулинемия ведет к снижению чувствительности клеток к инсулину и развитию инсулинорезистентности [Saad, et al., 1991], что является предиктором развития СД2 [Weyer, et al., 2000].

Длительная экспозиция β -клеток с высокими концентрациями глюкозы ведет к снижению секреторных возможностей инсулинового аппарата [Abebe, et al., 2023]. Обусловленная длительной неконтролируемой гипергликемией глюкозотоксичность ведет к необратимым повреждениям клеточных компонентов, участвующих в синтезе, накоплении и секреции инсулина за счет возникающего окислительного стресса в результате продукции активных форм кислорода при повышенном окислении глюкозы [Brownlee, 2001; Nishikawa¹, et al., 2000], а также к деструкции и апоптозу β -клеток [Poitout, et al., 2002].

Ожирение является фактором, отягощающим развитие СД2 [Kahn, et al., 2006; Al-Sulaiti, et al., 2019]: накопление свободных жирных кислот ведет к нарушению инсулин-индуцированного транспорта глюкозы, что ведет к усилению инсулинорезистентности клеток печени и мышц [Boden, et al., 1997; Dresner, et al., 1999]. Пролиферация клеток жировой ткани стимулирует выработку адипоцитами цитокинов, которые индуцируют апоптотическую гибель клеток поджелудочной железы [Kharroubi, et al., 2004]. В условиях гипергликемии окисление глюкозы усиливается, что ведет к усилению продукции малонил-коэнзима А, который блокирует карнитин-пальмитоилтрансферазу 1 – скорость-лимитирующий фермент окисления свободных жирных кислот, это приводит к торможению дальнейшего β -окисления свободных жирных кислот в цитоплазме клетки и усилению синтеза липидных сигнальных молекул, таких как сфинголипиды, ди- и триацилглицеролы, фосфатидная кислота, фосфолипиды [Poitout, et al., 2010]. В дополнение к этому снижение способности инсулина подавлять концентрацию свободных жирных кислот при СД2 [Chen, et al., 1987] в условиях высоких концентраций глюкозы

также ведет к ингибированию β -окисления жирных кислот в митохондриях [Rasmussen, et al., 2002] и образованию липидов цитотоксического комплекса (церамидов) [Shimabukuro, et al., 1998], что обуславливает липотоксичность, способствует активации свободнорадикального окисления и продукции активных форм кислорода [Lowell, et al., 2005], усиливает апоптоз [Shimabukuro, et al., 1998]. «Порочный круг» замыкает еще большее снижение продукции инсулина путем ингибирования транскрипции гена инсулина, биосинтеза проинсулина и секреции инсулина в результате липотоксичности, вызванной хроническим воздействием полинасыщенных жирных кислот [Roomp, et al., 2017; Choi, et al., 2023].

Обусловленные глюколипотоксичностью осложнения при СД2 включают микро- и макрососудистые поражения: ретинопатии; периферические невропатии; коронарные сосудистые заболевания артерий и периферических сосудов, протеинурию / альбуминурию [Brownlee, 2005; Cusick, et al., 2005].

1.2.1 Генетическая предрасположенность к инсулиннезависимому сахарному диабету

Мутации генов ключевых ферментов метаболизма глюкозы, ее транспортеров, генов инсулина и его рецептора определяют генетическую предрасположенность развития ИНЗСД [Yahaya, et al., 2019]. Описано около 30 мутаций в гене инсулинового рецептора, приводящих к инсулинорезистентности при СД2. Однако, не только дефекты структуры самого инсулинового рецептора, но и нарушения структуры субстрата тирозинкиназного домена инсулинового рецептора (IRS-1) ведут к нарушениям передачи сигнала от инсулина [Almind, et al., 1993].

Мутации в гене глюкозного транспортера могут обуславливать развитие данного заболевания. У некоторых больных ИНЗСД обнаружена аминокислотная замена T110I в белке глюкозного транспортера GLUT-2 в β -клетках поджелудочной железы [Mueskler, et al., 1994]. Транспортер глюкозы GLUT-4 осуществляет транспорт глюкозы в миоцитах и адипоцитах. Имеются данные о том, что мутации гена этого транспортера могут быть ассоциированы с ИНЗСД [Cox, et al., 1988].

Мутации гена гексокиназы (глюкокиназы) клеток поджелудочной железы ведут к развитию симптомов сахарного диабета взрослых в юности (MODY) [Filibeli, et al., 2022]. Этот фермент обуславливает чувствительность β -клеток и гепатоцитов к концентрации глюкозы крови. При дефекте гексокиназы ответ β -клеток на изменение концентрации глюкозы ослабевает, что ведет к развитию умеренной гипергликемии натощак.

Гликогенсинтаза — ключевой фермент синтеза гликогена в клетках печени и мышц. Дефекты гена гликогенсинтазы обуславливают ранние стадии развития ИНЗСД [Thorburn, et al., 1991].

Мутации генов рецептора глюкагона [Fujisawa, et al., 1995], β -3-адренергического рецептора [Kadowaki, et al., 1995] и других генов также обуславливают развитие ИНЗСД.

1.2.2 Патогенез инсулиннезависимого сахарного диабета.

Патогенез ИНЗСД обусловлен нарушением нормального гомеостаза глюкозы, который определяется тремя факторами: продукцией глюкозы печенью, транспортом глюкозы в клетки, глюкозозависимой секрецией инсулина β -клетками поджелудочной железы [DeFronzo, et al., 1997].

Путь биохимических реакций индуцированной глюкозой секреции инсулина включает ряд этапов (Рисунок 1.15). Глюкоза поступает в β -клетки поджелудочной железы, где ингибирует АТФ-зависимые K^+ -каналы (возможно, из-за стимуляции продукции АТФ), что приводит к мембранной деполяризации. Деполяризация приводит к открытию Ca^{2+} -каналов и увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что стимулирует секрецию β -клетками гранул с инсулином. В секреции гранул инсулина выделяют 2 фазы. В первую быструю фазу упакованные инсулином гранулы на внутренней стороне плазматической мембраны β -клеток незамедлительно экзоцитируются в кровь в ответ на глюкозный стимул, первая фаза характеризуется резким, но непродолжительным увеличением концентрации инсулина в крови. Во второй фазе концентрация инсулина нарастает медленнее и достигает «плато» через 2 часа [Pedersen, et al., 2019].

Инсулин взаимодействует с инсулиновым рецептором на плазматической мембране клеток организма, что ведет к димеризации инсулинового рецептора, аутофосфорилированию его цитоплазматического домена и появлению в нем тирозинкиназной активности, которая ведет к фосфорилированию субстратов инсулинового рецептора 1 и 2 (IRS1 и IRS2) по остаткам тирозина и делает возможным дальнейшую передачу инсулинового сигнала в клетке [Boucher, et al., 2014; Fu, et al., 2013].

Фосфорилирование IRS1 и IRS2 продолжает путь фосфорилирования нижестоящих сигнальных белков-мишеней - фосфатидилинозитид-3-киназы (PI3K) или класса малых GTPаз (RAS), которые являются двумя основными путями в опосредованной инсулином передаче сигнала. PI3K — основной путь метаболического действия инсулина. Фосфорилирование PI3K катализирует генерацию фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата

(PIP3) из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата, что рекрутирует на плазматическую мембрану фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу-1 (PK1), которая при совместном действии с киназным комплексом 2 механистической мишени рапамицина (mTORC2) ведет к фосфорилированию остатков S473 и T308, что активирует Akt [Manning, et al., 2017; Huang, et al., 2018]. Akt фосфорилирует ряд нижестоящих мишеней, что приводит к:

- активации и транслокации глюкозного транспортера GLUT-4 [Mattei, et al., 2021], отвечающего за поглощение глюкозы клетками организма;

- инактивации киназы гликогенсинтезы 3 [McManus, et al., 2005] и, как следствие, активации синтеза гликогена;

- перемещению из ядра в цитозоль транскрипционного фактора FOXO1, подавляющего выработку глюкозы печенью [Lee, et al., 2017];

- активации синтеза белков и липидов через активацию киназного комплекса 1 механистической мишени рапамицина mTORC2 [Zhang, et al., 2021], который усиливает трансляцию мРНК белков-мишеней необходимых для роста и пролиферации клеток, усилению гликолиза [Düvel, et al., 2010], а также ингибированию аутофагии [Kim, et al., 2011].

Сигнальный путь RAS-митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) в основном опосредует влияние инсулина на глюкозный транспортер GLUT-4 через активацию p38 митоген-активируемой протеинкиназы [Somwar, et al., 2000].

В норме инсулин стимулирует захват глюкозы клетками и подавляет продукцию глюкозы печенью. При ИНЗСД инсулиновый ответ ослабевает [Revers, et al., 1984], что нарушает подавление продукции глюкозы печенью [Jeng, et al., 1994] и препятствует утилизации постпрандиальной глюкозы крови вследствие нарушения ее захвата клетками, в то время как клетки продолжают испытывать недостаток глюкозы [DeFronzo, et al., 1985]. Нарушения в захвате глюкозы клетками могут быть вызваны уменьшением числа или дефектами в структуре инсулиновых рецепторов на клетках эритроцитов, моноцитов, адипоцитов и других типов [DePirro, et al., 1980], а также нарушением транспорта глюкозы глюкозными транспортерами GLUT-2 в клетках поджелудочной железы [Reddy, et al., 1998] и GLUT-4 в клетках печени и мышц, жировой ткани [Garvey, et al., 1988].

Поступившая глюкоза может быть окислена в ходе гликолиза и затем цикла Кребса (окислительный путь метаболизма глюкозы), или запасена в виде гликогена (в клетках печени и мышц) за счет работы гликогенсинтазы и других ферментов, участвующих в синтезе гликогена (неокислительный путь). При ИНЗСД синтез гликогена снижается [Thorburn, et al., 1991], а также начинает преобладать окисление глюкозы по альтернативным путям над ее окислением в ходе гликолиза, включая полиоловый

[Tigchelaar, et al., 2022], гексозаминовый [Marshall, et al., 1991] и путь неферментативного гликирования [Brings, et al., 2017].

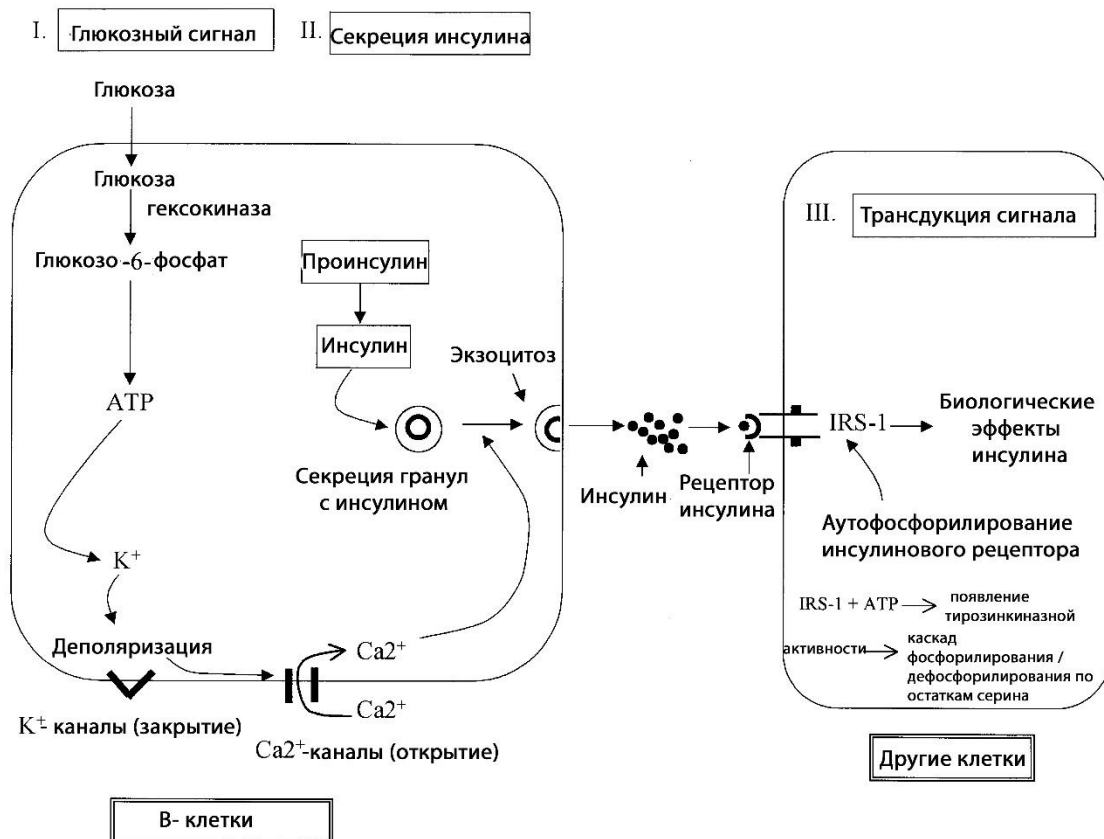


Рисунок 1.15. Схема метаболических функций β -клеток поджелудочной железы, действия инсулина на клетки (см. пояснения в тексте)

В аномальном или резистентном к инсулину состоянии происходит потеря начальной фазы секреции инсулина (первая фаза) в ответ на глюкозную нагрузку [Bunt, et al., 2007; Yuan, et al., 2021], приводящая к постпрандиальной гипергликемии. Впоследствии, увеличение концентрации инсулина во второй фазе вызывает хроническую гиперинсулинемию [Saad, et al., 1989]. Обычно инсулин может связываться с рецептором инсулина на клеточной мембране, что приводит к возбуждению тирозинкиназы рецептора инсулина [Whitehead, et al., 2000] и фосфорилированию ряда белков, из которых в сигнальном каскаде инсулина ключевыми являются IRS1 и IRS2 [Aziz, et al., 2020]. Хроническая гиперинсулинемия приводит к фосфорилированию по остаткам серина и треонина IRS, что способствует протеасомой деградации IRS через активацию p38, и препятствует фосфорилированию остатков тирозина, что является классическим путем фосфорилирования при передаче сигнала инсулина через PI3K- Akt- FOXO1, что ведет к резистентности к инсулину [Qi, et al., 2013]. Инсулинчувствительные ткани не могут эффективно реагировать на инсулин, что ведет к нарушению толерантности к глюкозе.

Инсулин-опосредованное поглощение глюкозы, гликолиз и гликогеновый синтез нарушаются. Со временем резистентность к инсулину прогрессирует, и клетки поджелудочной железы постепенно снижают свою функцию до полной ее потери и как, следствию, гибели [Poitout, et al., 2002; Abebe, et al., 2023].

При диабете ткани испытывают недостаток кислорода [Catrina & Zheng, et al., 2021]. Адаптация клеток к гипоксии реализуется через защитные механизмы, такие как метаболическое перепрограммирование митохондриального окислительного фосфорилирования в анаэробный гликолиз, усиление эритропоэза [Xie, et al., 2021] и ангиогенеза [Zhang, et al., 2018]. Ключевую роль в запуске адаптивных механизмов играют факторы, индуцируемые гипоксией (HIF). Однако при диабете передача сигналов HIF нарушена, в первую очередь по причине дестабилизации одной из его субъединиц – HIF-1 α . Такие нарушения стабилизации HIF-1 α могут быть обусловлены ковалентной модификацией продуктом конечного гликирования – метилглиоксалем [Yang, et al., 2020], избытком железа в клетках [Duscher, et al., 2017], непосредственно высокими концентрациями глюкозы [Catrina, et al., 2004], подавлением образования сукцината в ходе гликолиза в присутствии высоких концентраций жирных кислот [Dodd, et al., 2018]. Нарушение HIF-сигнального пути обусловлено ковалентной модификацией метилглиоксалем коактиватора транскрипции p300 [Thangarajah, et al., 2010]. Учитывая влияние HIF-сигнальной системы на секрецию инсулина β -клетками [Spégel, et al., 2011], фармакологическая коррекция этого пути представляется перспективной.

1.2.3 Гипергликемия при инсулиннезависимом сахарном диабете

Длительная гипергликемия ведет к развитию осложнений сахарного диабета посредством активации полиолового пути, что ведет к снижению уровня восстановленного глутатиона [Lee, et al., 1999; Tigchelaar, et al., 2022], усилению образования конечных продуктов неферментативного гликирования (AGE) [Brings, et al., 2017], активации протеинкиназы C через избыточное накопление диацилглицерола [Rolo, et al., 2006], образование гексозаминов, усиливающее инсулинорезистентность [Marshall, et al., 1991].

Гипергликемия является причиной повышенного неферментативного гликирования в реакциях Майяра белков, липидов и нуклеионовых кислот. Гликирование белков – спонтанный неферментативный посттрансляционный процесс, протекающий в организме в норме, в ходе которого происходит присоединение остатков глюкозы и других углеводов к свободным аминогруппам белков [Popova, et al., 2010]. Степень гликирования белков зависит от концентрации глюкозы в крови и от скорости обновления белка. В

результате присоединения молекулы глюкозы к свободной NH₂-группе лизина, аргинина или к свободному N-концу белка образуется первый продукт гликирования – основание Шиффа (Рисунок 1.16). Эта реакция является быстрой и обратимой.

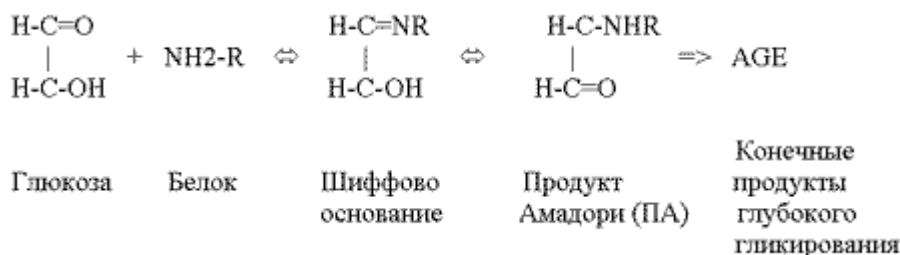


Рисунок 1.16. Схема реакция образования конечных продуктов гликирования

Шиффово основание нестабильно и легко преобразуется в продукт Амадори – это второй продукт гликирования и объект многих клинических анализов на гликированные белки [Hedge, et al., 1953; Schmutzler, et al., 2022]. Продукт Амадори подвергается дальнейшим метаболическим превращениям, что ведет к образованию конечных продуктов гликирования, например, фруктозамина, карбоксиметиллизина, метилглиоксаля [Brownlee, 2005; Vander Jagt, et al., 1992].

Образование внутри- и внеклеточных конечных продуктов гликирования влияет на структуру, узнавание и связывание с рецепторами, функциональную активность многих белков, поскольку может приводить к изменению их заряда и конформации, отрыву боковых радикалов а.о., к разрыву полипептидной цепи. Неферментативному гликированию подвергаются белки мембран эритроцитов, гемоглобин, белки плазмы крови (альбумин, аполипопротеины, Tf, Cp и другие), белки эндотелия сосудов, белки хрусталика, многие ферменты. Эндогенные метаболиты метилглиоксаль и аминокетон, образующиеся при сахарном диабете, вызывают окислительную модификацию и агрегацию Cp [Dutra, et al., 2005; Sanda, et al., 2022]. При СД2 типа усиливается гликирование сывороточного Tf, что снижает его способность связывать ионы железа [Van Campenhout, et al., 2004], при этом модифицированный Tf становится источником образования супероксиданионного радикала и гидроксильного радикала [Fujimoto, et al., 1995]. Показано, что гликирование аминокетонных групп хрусталика у крыс повышает чувствительность этих белков к окислению сульфгидрильных групп, что ведет к образованию высокомолекулярных белковых агрегатов и помутнению хрусталика [Ranjan, et al., 2006]. AGE вызывают супрессию продукции инсулина β-клетками [Tajiri, et al., 1997].

Культивирование эндотелиальных клеток на среде содержащей гликированный коллаген 1 типа ведет к уменьшению ветвления эндотелиальных капилляро-подобных тяжей по сравнению ветвлением тяжей эндотелиальных клеток, растущих на среде с негликированным коллагеном 1 типа [Kuo, et al., 2007]. Следует отметить, что многочисленные данные подтверждают связь AGE с поражением сосудов [Singh, et al., 2014], которое является одним из ключевых факторов в развитии таких осложнений при сахарном диабете как ретинопатии, нефропатии, нейропатии, миокардиопатии, поражении периферических сосудов, ведущего к гангрене. Гликированные белки и продукты конечного гликирования связываются со специфическим рецептором [Indyk, et al., 2022] на поверхности эндотелиальных клеток, клеток моноцитарно-макрофагального ряда, гладкомышечных клеток, принимающих участие в развитии атеросклеротических процессов, что индуцирует окислительный стресс и провоспалительные реакции.

Фосфолипиды плазматических мембран, содержащие в своем составе первичные амины, также могут реагировать с глюкозой с образованием конечных продуктов гликирования, что ведет к усилению перекисного окисления липидов в липопротеиновых частицах. Модифицированные конечными продуктами гликирования липопротеины узнаются специфическими рецепторами эндотелиальных клеток [Araki, et al., 1995; Yashima, et al., 2020], что способствует повышению проницаемости эндотелия, проникновению окисленных липопротеинов в субэндотелиальное пространство, хемотаксису моноцитов и их дифференцировку в макрофаги и пенные клетки, что ведет к формированию атеросклеротических бляшек. Взаимодействие между продуктами конечного гликирования и их рецепторами усиливает адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам через стимулирование экспрессии ядерного фактора κB (NF- κB) [Bierhaus, et al., 2001; Dorenkamp, et al., 2023]. Показано, что гликирование аполипопротеина В-100 повышает его подверженность окислительной модификации, узнаванию скавэнджер-рецепторами макрофагов [Klein, et al., 1995], аккумуляции эфиров холестерина в клетках эндотелия сосудов, и, в конечном счете, прогрессированию атеросклероза. В опытах по гликированию *in vitro* липопротеинов высокой плотности показано уменьшение их параоксоназной активности. [Ferretti, et al., 2001]. Параоксоназа, являясь белком антиоксидантной защиты, гидролизует пероксиды; уменьшение ее ферментативной активности может способствовать ускоренному развитию атеросклеротических процессов.

Блокирование гликолиза на стадии образования триозофосфатов ведет к накоплению α -оксальальдегидов (метилглиоксаля, глиоксаля, 3-деоксиглюкозона) [Che, et al., 1997; Richard, 1993], что ведет к повреждению белков, липидов и ДНК, вызывая

«карбонильный стресс» и индукцию апоптоза, а также к накоплению α -глицерофосфата, предшественника диацилглицерола [Rolo, et al., 2006], активации протеинкиназы С. Активация протеинкиназы С (серин-треониновой киназы) запускает каскад реакций: фосфорилирование остатков серина и треонина в молекуле субстрата инсулинового рецептора [Ravichandran, et al., 2001], предупреждая фосфорилирование его тирозиновых остатков, что ведет к нарушению связывания IRS-1 с рецептором инсулина и нарушению проведения инсулинового сигнала в клетку.

1.2.4 Окислительный стресс и инсулиннезависимый сахарный диабет

Длительная гипергликемия обуславливает «глюкотоксичность» и ведет к развитию окислительного стресса [Ghiselli, et al., 1992; Shin, et al., 2001].

Окислительный стресс является результатом дисбаланса между выработкой активных форм кислорода (АФК) и способностью антиоксидантной защиты справиться с ними, что приводит к окислительному повреждению ДНК, белков и липидов.

Повышение уровней АФК при гипергликемии ведет к усилению выработки воспалительных цитокинов и развитию инсулинорезистентности [Lin, et al., 2005].

Повышение продукции АФК ведет к активации поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы [Kiss, et al., 2005], что в конечном итоге ведет к инактивации ключевого фермента гликолиза – глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [Kiss, et al., 2003], блокирует гликолиз и направляет глюкозу на окисление по полиоловому пути, стимулирует образование диацилглицерола, повышает аккумуляцию конечных продуктов неферментативного гликирования, активирует протеинкиназу С.

Присоединение метилглиоксаля к аминокетонам белков ведет к образованию АФК и свободно-радикальных форм белков [Yim, et al., 1995]. AGE ведут к активации NAD(P)H-оксидаз [Wautier, et al., 2001], что приводит к усилению синтеза супероксиданион радикала, что в свою очередь способствует активации транскрипционного фактора NF- κ B, экспрессии индуцибельной NO-синтазы и развитию нитрозирующего стресса [San Martin, et al., 2007]. Высокая корреляция между образованием NO \cdot и ингибированием синтеза инсулина указывает на ключевую роль радикала в данном процессе [Mussa, et al., 2020].

Гипергликемия способствует снижению концентрации восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) через инактивацию глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Zhang, et al., 2010] (фермента, генерирующего NADPH клеток), что

приводит к угнетению восстановления глутатиона NADPH-зависимой глутатионредуктазой.

Митохондриальная дисфункция играет важную роль в развитии окислительного стресса при гипергликемии [Rolo, et al., 2006]. Супероксиданион радикал активирует H^+ -разобщитель электрон-транспортной цепи митохондрий (UCP2) [Echtay, et al., 2002], что, в конечном счете, ведет к нарушению производства АТФ, снижению соотношения АТФ/АДР и к нарушению секреции инсулина в ответ на глюкозный стимул. Снижение производства супероксиданион радикала подавляет патологические осложнения, вызванные гипергликемией [Nishikawa², et al., 2000].

Следует отметить, что для β -клеток поджелудочной железы характерна низкая экспрессия антиоксидантных ферментов [Gurgul-Convey, et al., 2016; Kovačević, et al., 2022], что ослабляет их способность справляться с окислительным стрессом.

Антиоксиданты предотвращают негативное влияние высоких концентраций глюкозы на связывание с промотором инсулина PDX-1 и MafA [Harmon, et al., 2005], ключевых транскрипционных факторов, отвечающих за экспрессию генов, регулирующих созревание и дифференцировку клеток поджелудочной железы [Nasteska, et al., 2021; Zhu, et al., 2017].

1.2.5 Гликированный гемоглобин как биохимический маркер оценки степени выраженности сахарного диабета

При диагностике и контроле лечения в качестве объективных маркеров гликирования белков используют такие показатели как концентрация конечных продуктов гликирования и концентрация продуктов Амадори. Одним из таких маркеров, который используют для оценки влияния гликирования на белки, является гликированный гемоглобин, количество которого определяется как процентная доля от общего гемоглобина крови [Holmquist, et al., 1966]. Существует несколько продуктов - гликированных гемоглобинов: HbA1a₁, HbA1a₂, HbA1b, HbA1c. Последняя форма количественно преобладает (более 80%) и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности сахарного диабета. Реакция образования HbA1c – присоединение остатка глюкозы к N-концевому остатку валина β -цепей гемоглобина, протекает в две стадии (Рисунок 1.17). Реакция образования прегликированного гемоглобина (преА1с) является быстрой и обратимой, в отличие от реакции образования, собственно, гликированного гемоглобина, которая является медленной и необратимой. Концентрация гликированного

гемоглобина отражает концентрацию глюкозы на протяжении жизни эритроцитов (около 120 дней).

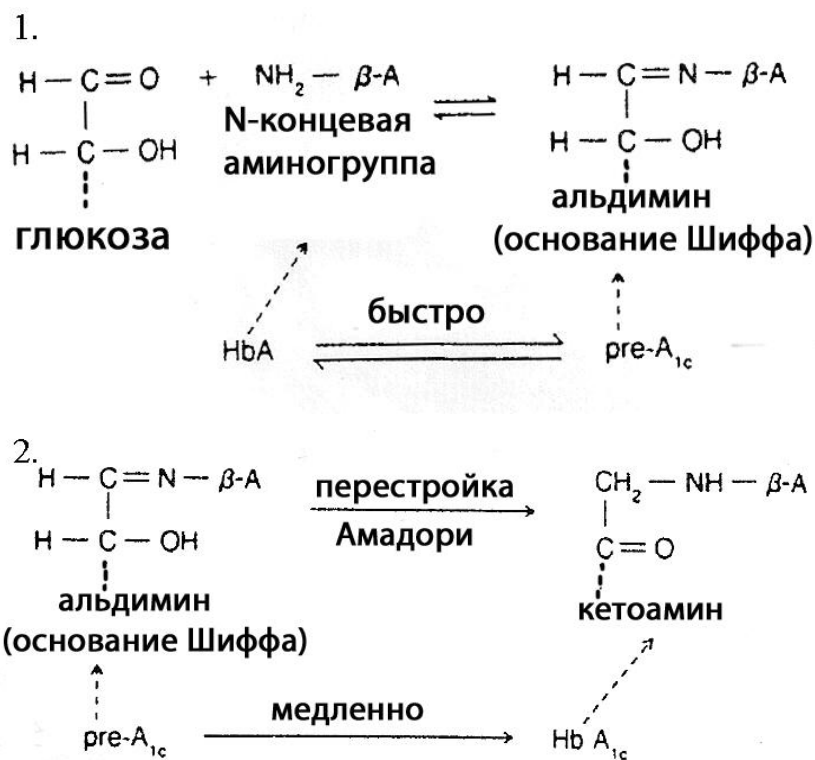


Рисунок 1.17. Схема реакция образования гликированного гемоглобина (HbA1c)

Уровень гликированного гемоглобина служит важным клиническим показателем при диагностике преддиабета и сахарного диабета [Li, et al., 2019], мониторинге течения и контроле лечения больных сахарным диабетом, при определении уровня компенсации сахарного диабета, при оценке рисков смертности и прогнозировании осложнений диабета [Lee, et al., 2021], а также при обследовании беременных женщин на выявление скрытых форм диабета [Khan, et al., 2020; American Diabetes Association, 2021].

В качестве другого независимого маркера при оценке степени гликирования белков используется концентрация фруктозамина. Фруктозамин, как один из продуктов гликирования, образуется в реакции присоединения глюкозы к свободным аминогруппам белка (в основном альбумина плазмы крови) с последующей циклизацией и образованием стабильного продукта – 1-амино-1-деоксифруктозного производного белка [Armbruster, et al., 1987] (Рисунок 1.18).

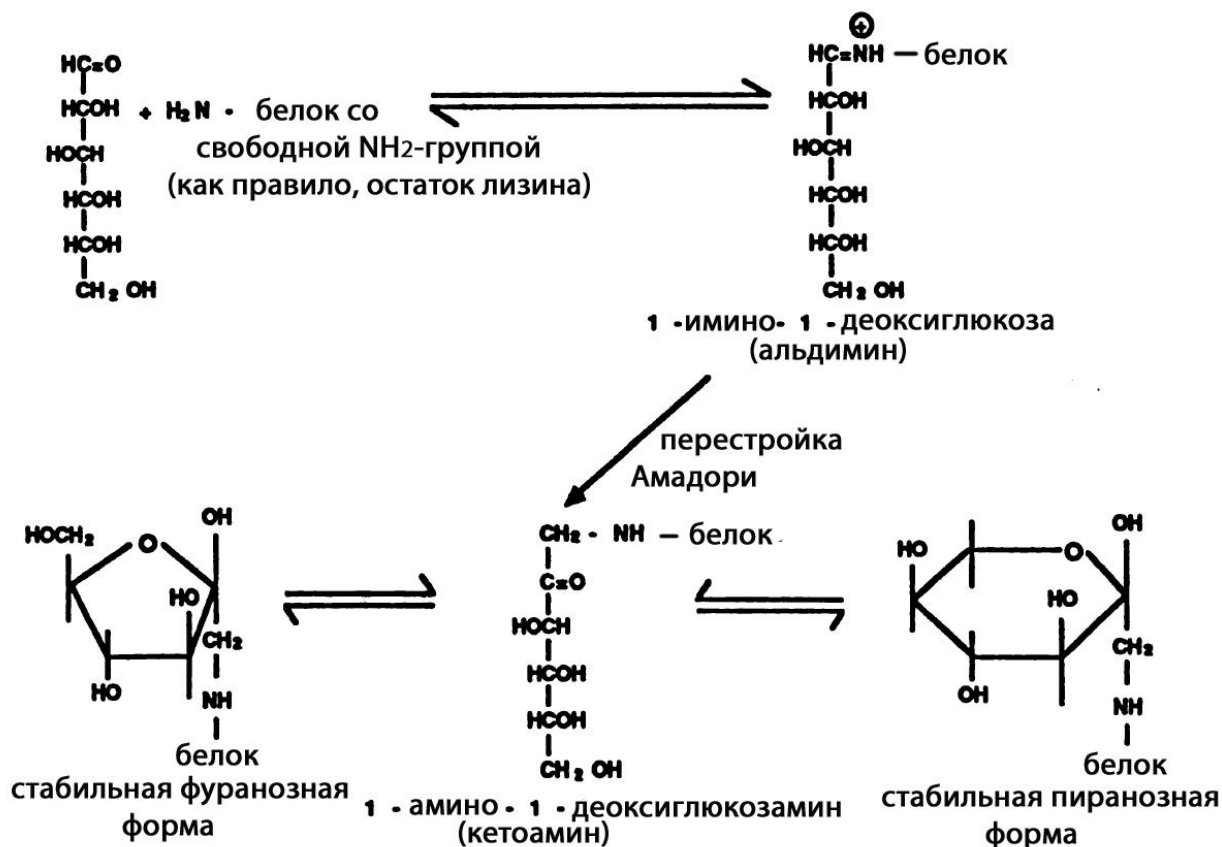


Рисунок 1.18. Схема реакций гликирования белков по свободным аминогруппам с образованием 1-амино-1-деоксиглюкозамина (фруктозамина)

Концентрация фруктозамина отражает среднюю концентрацию глюкозы за последние 2-3 недели, что является более удобным маркером при краткосрочном контроле лечения сахарного диабета, чем использование HbA1c. Между уровнем фруктозамина плазмы крови и уровнем гликированного HbA1c наблюдается положительная корреляция [Yue, et al., 1980].

1.3 Связь метаболизма железа и инсулиннезависимого сахарного диабета

От 30 до 80 % больных гемохроматозом – наследственной патологией, при которой повышено всасывание железа в кишечнике и его накопление в тканях, страдает от СД2 [Adams, et al., 1997]. Накопление железа ведет к инсулинорезистентности, что вызывает гипергликемию в периферических тканях и, как следствие, гиперинсулинемию [Niedermaier, et al., 1984]. Потеря способности секреции инсулина одна из причин, ведущих к диабету при гемохроматозе [McClain, et al., 2006].

Однако имеются данные о том, что инсулинорезистентность может быть ассоциирована с избыточным отложением железа в тканях и органах пациентов без

типичной клинической картины гемохроматоза [Mendler, et al., 1999]. Возможно, это объясняется тем, что инсулин стимулирует захват железа клетками (Рисунок 1.19), а также возврат TfR на цитоплазматическую мембрану [Davis, et al., 1986]. Показано, что в микросомальных мембранах адипоцитов TfR колокализован с инсулинзависимым транспортером глюкозы, и, что инсулин оказывает эффект не только на транспорт глюкозы, но и на транспорт железа за счет увеличения на поверхности клеток TfR [Tanner, et al., 1987]. Железодефицитная диета у мышей ведет к увеличению чувствительности к инсулину [Cooksey, et al., 2010].

Накопление железа в организме повышает риск развития преддиабета и СД2 [Akter, et al., 2017; Jiang, et al., 2004], положительно коррелирует с концентрацией глюкозы натощак [Fumeron, et al., 2006]; уровнем HbA1c [Momeni, et al., 2015], уровнем инсулина натощак [Ren, et al., 2004].

Окислительный стресс, развивающийся при СД2, стимулирует инсулинорезистентность и увеличивает синтез Ft [Chen, et al., 2018]. Причинами повышения концентраций Ft могут являться хроническое воспаление при сахарном диабете и окислительный стресс, обусловленный реакциями с участием Fe^{2+} и Fe^{3+} , особую протекторную роль повышение концентрации Ft может играть для β -клеток поджелудочной железы [MacDonald, et al., 1994], для которых характерны пониженные концентрации ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксиддисмутазы) и повышенная чувствительность к АФК [Gurgul-Convey, et al., 2016; Kovačević, et al., 2022], сниженная экспрессия FPN [Hudson, et al., 2010] и повышенная экспрессия DMT1 [Koch, et al., 2003].

Перегрузка железом также влияет на скелетные мышцы, основной эффектор действия инсулина. Исследования *in vitro* показали, что введение хелаторов железа ведет к увеличению поглощения глюкозы вследствие усиления экспрессии GLUT-1 в клетках мышечной линии L6 [Potashnik, et al., 1995].

Имеются данные о том, что ацерулоплазминемия, также сопровождается развитием ИНЗСД [Miyajima, et al., 1996]. Ацерулоплазминемия – наследственное заболевание, обусловленное мутацией в гене *Sr*. При данном заболевании наблюдается повышенное отложение железа в тканях и органах [Miyajima, et al., 2003]. У мышей, нокаутированных по генам *Hr* и *Sr*, происходит нарушение углеводного метаболизма, что ведет к развитию сахарного диабета 2 типа (наблюдается более высокая концентрация глюкозы натощак и отмечается нарушение толерантности к инсулину) [Zheng, et al., 2018].

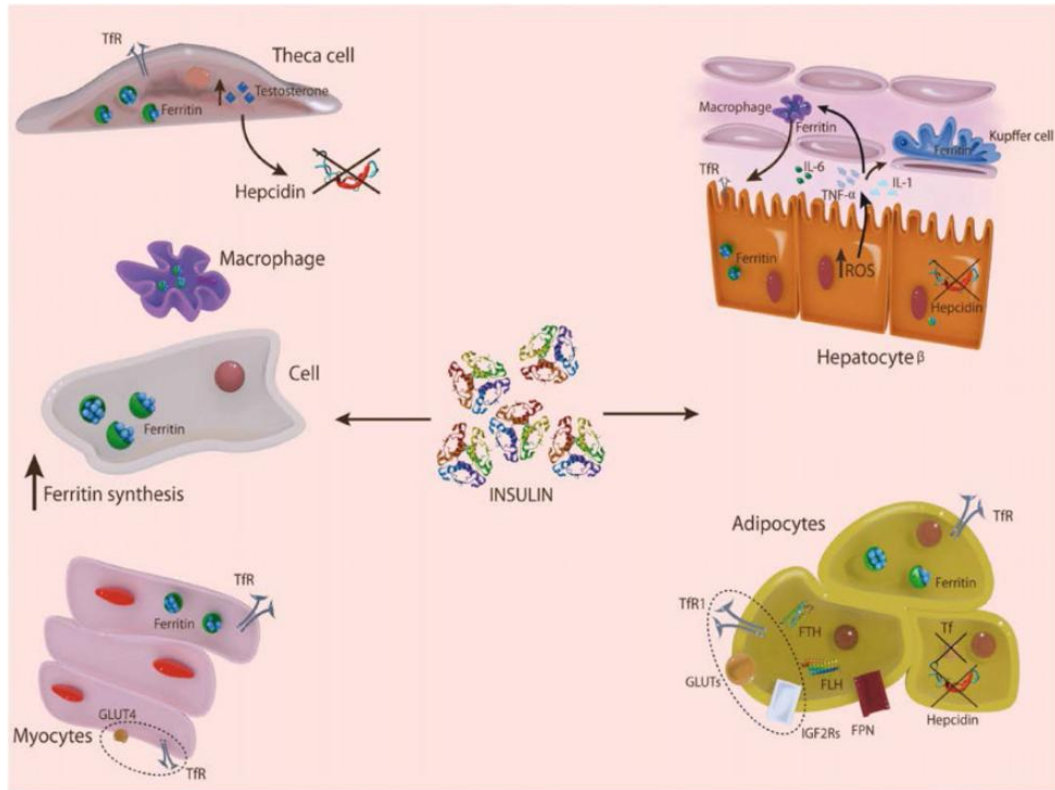


Рисунок 1.19. Влияние инсулина на метаболизм железа (см. пояснения в тексте)

Показано снижение уровней мРНК адипонектина при СД2 [Gabrielsen, et al., 2012]. Адипонектин представляет собой секретируемый адипоцитами цитокин. Адипонектин является инсулин-сенсibiliзирующим адипокином, и мыши, лишённые адипонектина, проявляли инсулинорезистентность и непереносимость глюкозы [Nawrocki, et al., 2006]. Накопление железа снижает уровень экспрессии адипонектина путем посттрансляционной модификации транскрипционного фактора FOXO1 [Gabrielsen, et al., 2012].

На стрептозотоциновой модели гипергликемии у крыс показано увеличение абсорбции железа клетками кишечника и снижение уровня гепцидина в печени, что обуславливает накопление железа при СД2; на модели клеточной линии HepG2 показана положительная регуляция уровня экспрессии гепцидина инсулином [Wang, et al., 2014]. Терапия с применением хелатора железа деферипрона облегчала нефропатические осложнения при СД2 у крыс [Zou, et al., 2017].

У пациентов уровень насыщения Tf снижен (менее 20%) при начальных этапах инсулинорезистентности и незначительном повышении концентрации глюкозы натощак (преддиабет) [Cheung, et al., 2013] и увеличен (более 50%) при диабете [Ellervik, et al., 2011].

Ферроптоз представляет собой форму неапоптотической регулируемой гибели клеток [Dixon, et al., 2012] в результате железозависимого накопления перекисей липидов,

обусловленного недостаточностью окислительно-восстановительных ферментов, особенно глутатионпероксидазы 4 (GPX4) [Gaschler, et al., 2018; Xu, et al., 2021]. Ферроптоз сопровождается митохондриальной дисфункцией [Du, et al., 2019], выработкой большого количества активных форм кислорода, стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [Kagan, et al., 2017], нарушением биосинтеза инсулина и стимулированной глюкозой секреции инсулина [Bruni, et al., 2018]. Ферроптотическая гибель β -клеток обуславливает патогенез диабетических осложнений, таких как ишемия миокарда и диабетическая кардиомиопатия [Fang, et al., 2019].

При СД2 концентрация TfR повышена [Fernández-Cao, et al., 2017], это повышение может быть компенсаторно обусловлено недостаточным насыщением трансферрина вследствие его модификации продуктами конечного гликирования [Golizeh, et al., 2017]. Поскольку TfR наряду с рецептором ангиотензинпревращающего фермента-2 (ACE2) связывается со Spike-белком вируса SARS-CoV-2 [Tang, et al., 2020; Sokolov, et al., 2022; Wang, et al., 2023] и способствует интернализации вируса в клетку, то увеличение концентрации TfR при СД2 может усугублять контагиозность коронавирусной инфекции и усиливать тяжесть острого респираторного синдрома. Нарушения обмена железа и ожирение при СД2 являются факторами высокой смертности от SARS-CoV-2 [Suriawinata & Mehta, 2022], таким образом понимание связи обмена железа и гипергликемии может быть перспективно для поиска подходов для снижения смертности.

1.4 Протективный потенциал Lf при гипергликемии

Белок 1, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности, или рецептор для α_2 -микроглобулина, или рецептор аполипопротеина E (LRP1, LDL-receptor related protein 1) – рецептор аполипопротеина E на поверхности клеток печени, выполняет регуляцию гомеостаза глюкозы и транспорта постпрандиальных липидов [Hofmann, et al., 2007]. Lf конкурирует с аполипопротеином E за связывание с LRP1 и подавляет поглощение печенью ремнантов хиломикронов [Van Dijk, et al., 1992].

Инсулинорезистентность сопровождается хроническим воспалением и развитием окислительного стресса [Moreno-Navarrete, et al., 2011]. При активации клеток иммунной системы эндотоксинами, модифицированными липопротеинами и продуктами гликирования белков повышается концентрация провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и др.. LF блокирует связывание белков, модифицированных продуктами неферментативного окисления глюкозы [Schmidt, et al., 1992], и модифицированных LDL

[Kajikawa, et al., 1994], что опосредованно снижает продукцию провоспалительных цитокинов, препятствуя развитию окислительного стресса.

Инсулинорезистентность при СД2 усиливается у людей с ожирением [Dandona, et al., 2004], что сопровождается минимальной экспрессией гена *Lf* [Moreno-Navarrete, et al., 2013]. Увеличение количества адипоцитов в жировой ткани ведет к усилению продукции адипокинов, которые регулируют метаболизм липидов и глюкозы, играя важную роль в развитии толерантности к инсулину [Kim, et al., 2007]. При диабете происходит усиление неполного окисления жирных кислот, что ведет к продукции АФК и, как следствие, развитию атеросклеротических макро- и микроповреждений сосудов. В адипоцитах бурого жира *LF* увеличивает потребление клетками кислорода и усиление генерации тепла в результате разобщения процессов окисления жирных кислот и синтеза АТФ, что опосредуется через усиление экспрессии гена митохондриального разобщающего белка 1 (термогенина, *UCP1*) [Nakamura, et al., 2018]. Увеличение синтеза *UCP1* снижает ожирение и увеличивает чувствительность к инсулину [Lim, et al., 2020]. *Lf* снижает интенсивность гликолиза и β -окисления жирных кислот путем нормализации экспрессии генов транспортера глюкозы 2, фосфофруктокиназы, а также гликогенсинтазы 2 и карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 в печени [Zapata, et al., 2017]. На модели ожирения у мышей показано снижение синтеза холестерина при совместном использовании антидиабетического средства метформина и *Lf*, опосредованное снижением синтеза липогенных ферментов [Min, et al., 2018]. У пациентов с СД2 и ожирением использование *Lf* в качестве терапевтического средства снижало уровень гликированного гемоглобина *A1c*, концентраций холестерина *LDL* и триглицеридов, провоспалительных цитокинов (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*), а также было зафиксировано увеличение активности супероксиддисмутазы в образцах сыворотки крови и количества транскрипционного фактора антиоксидантной защиты (*Nrf2*) и *PPAR γ* в экстракте ядер моноцитов [Mohamed, et al., 2018]. У пациентов с абдоминальным ожирением (индекс массы тела > 25 кг/м²), сопровождающимся снижением толерантности к глюкозе, гиперинсулинемией и дислипидемией, пероральное применение *Lf* из молока коров приводило к достоверному снижению массы тела, окружности бедер и талии [Ono, et al., 2010].

Диабетическая стопа является одним из самых опасных язвенных осложнений сахарного диабета, ведущей к ампутации поврежденной конечности и увеличению риска общей смертности. Причинами развития диабетической язвы стопы являются тканевая гипергликемия, которая негативно влияет на физиологическую активность кератиноцитов, фибробластов, макрофагов и эндотелиальных клеток, а также периферическая невропатия, персистирующие инфекции, нарушения кровообращения и ангиогенеза. В качестве

терапевтических средств в первую очередь используются активные биосовместимые раневые повязки и гели для облегчения заживления язв стопы. Lf в составе геля ускорял заживление ран у пациентов [Takayama & Aoki, 2012] и выживаемость клеток эпидермальной клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT [Fathil & Katas, 2023]. Lf нормализовал активность фибробластов и кератиноцитов, ангиогенеза, а также течение воспалительных процессов при заживлении ран.

Нарушение реакции на гипоксию вследствие ингибирования HIF-1 при диабете способствует прогрессированию заболевания и его осложнений [Catrina & Zheng, et al., 2021]. В то время как индукция передачи сигналов через HIF-1 способствует заживлению ран конечностей при диабете [Gao, et al., 2020], предупреждает развитие диабетической нефропатии [Jiang, et al., 2020], атеросклеротических повреждений [Rahtu-Korpela, et al., 2016], способствует восстановлению клеток миокарда после ишемии [Deguchi, et al., 2020], способствует выживанию β -клеток поджелудочной железы [Liang, et al., 2022]. Показано участие апо-Lf в стабилизации HIF-1 α [Zakharova, et al., 2012], а также в стабилизации транскрипционного фактора антиоксидантной защиты Nrf2 [Mohamed, et al., 2018] и индукции его транслокации в ядро [Zakharova, et al., 2018]. При взаимодействии с Cp апо-Lf превращается в холо-форму, которая не способна стабилизировать HIF-1 α , таким образом, взаимодействие Cp с Lf регулирует антигипоксическую активность Lf по механизму отрицательной обратной связи [Kostevich, et al., 2016].

Множественность эффектов Lf, связанных с регуляцией углеводного и липидного обменов, процессов воспаления, позволяет рассматривать его как перспективное средство для профилактики и лечения сахарного диабета 2-го типа и его осложнений.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы (квалификация х.ч. или выше без предварительной очистки): CaCl_2 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaNH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaOH , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, HEPES, ацетат натрия, нитросиний тетразолий, цитрат натрия (AppliChem Panreac, Испания); Chelex 100, Bio-Gel A-1,5m (гель агарозы), BioGel P-6, Tween 20, UNO-Sphere Q, конъюгат пероксидазы хрена с антителами осла к IgG кролика, окрашенные макеры молекулярной массы (Bio-Rad, США), N-этил-N'-диметиламино-пропилкарбодиимид, N-гидроксисукцинимид, этаноламин, полиоксиэтиленсорбитан («GE Healthcare Life Sciences», США); полиэтиленгликоль 6000, карбонат магния (Fluka, Швейцария); H_3PO_4 (80%), H_2O_2 (8M), H_3BO_3 , триэтиламин, ЭДТА (Merck, Германия); пероксидаза из корней хрена с $\text{RZ} > 3,0$ (MP Biomedicals, США) Сефароза 4B, Сефароза 6B, DEAE-Sephadex A-50, QAE-Sephadex A-50, CM-Сефароза, Phenyl-Сефароза, Sephadex G-200, Sephacryl S-200 HR, (Pharmacia, Швеция); контрольные сыворотки «Precinorm U», «Precipath U» (Roche Diagnostics, Швейцария); азид натрия, бромфеноловый синий, глицерин, персульфат аммония, полный и неполный адьюванты Фрейнда, Кумасси R-250 (Serva, Германия); Brij-35, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (соль Мора), NaBH_4 , $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$, альбумин сыворотки быка, 6-аминокапроновая кислота, 3M BrCN в хлористом метиле, гликированный альбумин быка (фруктозамин), D-(+)-глюкоза, орто-дианизидин, додецилсульфат натрия (SDS), 2-меркаптоэтанол, неомицина трисульфат, 3-(2-пиридил)-5,6-бис(4-фенилсульфоновая кислота)-1,2,4-триазин (феррозин), стрептозотоцина моногидрат, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлорида гидрат, тиогликолевая кислота, тиомочевина, фенилметил-сульфонилфторид (PMSF), триэтанолламин (Sigma-Aldrich, США); 4-(3,5-дибромо-2-пиридилазо)-N-этил-N-сульфопропиланилин (3,5-diBr-PAESA), 2-(5-нитро-2-пиридалазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенол (Nitro-PAPS), 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота, глутатион восстановленный, трет-бутилгидропероксид, этанол, 1-хлор-2,4-динитробензол (Sorachim, Франция); наборы для определения концентрации С-реактивного белка, трансферрина, HDL-холестерина, LDL-холестерина, глюкозы (АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», РФ), ацетонитрил (Крихром, РФ), Tris, агароза, акриламид, глицин, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (Лаборатория МЕДИГЕН, РФ); ферроцианид калия, трихлоруксусная кислота (Нева-Реактив, РФ), BaCl_2 , HCl , H_2SO_4 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaIO_4 , ацетон, барбитал, диэтиловый эфир, натрия барбитал, хлороформ, пара-фенилендиамина

дигидрохлорид (*p*-PD), уксусная кислота ледяная (РЕАХИМ, РФ); стандартный раствор гемиглобинцианида (Ренам, РФ). Антитела против Ср человека и Tf человека были любезно предоставлены к.б.н. Еленой Тихоновной Захаровой и д.м.н. Михаилом Михайловичем Шавловским (ФГБНУ «ИЭМ»).

В работе использовали следующее оборудование: ультрацентрифуга – Avanti J-301 (Beckman Coulter, США); вошер для иммуноферментного анализа – PW-40, камера для электрофореза – Mini-Protean Tetra Cell, хроматограф BioLogic DuoFlow Maximizer 20 (Bio-Rad, США); водяная баня –WB-4, миницентрифуга-вортекс Микроспин – FV-2400, термостат – TS-100С, термошейкер – PST-60HL-4 (BioSan, Латвия); мультимодальный ридер планшетов (ClarioStar, BMG Labtech, Германия); центрифуга Elmi (Elmi, Латвия); анализатор на эффекте поверхностного плазмонного резонанса – ViaCore X100, чипы с карбоксиметилдекстарном – CM5 (GE Healthcare Life Sciences, США); охлаждаемый концентратор – CentriVar (Labonco, США); автоматический биохимический анализатор – BS-200 (Mindray, Китай); ячейки для ультрафильтрации – VivaSpin 500 (30 кДа) VivaSpin 30 (30 кДа) (Sartorius, Германия); рН-метр – Аквилон рН-410 (Аквилон, РФ); камера для иммуноэлектрофореза – SE-2 (Компания Хеликон, РФ); спектрофотометр СФ-2000-02 («ОКБ-СПЕКТР»).

Образцы цельной крови (антикоагулянт Li–гепарин и антикоагулянт К₂–ЭДТА, Vacutest, Италия) и сыворотки крови (с активатором свертывания крови, Vacutest, Италия) от практически здоровых доноров и больных СД2 были получены и любезно предоставлены сотрудниками биохимической лаборатории Городского клинко-диагностического центра №1 Санкт-Петербурга. Критерием исключения образцов биологического материала из настоящего исследования являлась концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови более 10 мг/л. В исследование были включены 364 человека: в группу 1 – 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%). Весь биологический материал был получен с письменного согласия доноров (заключение локального этического комитета при ФГБНУ «ИЭМ» №419 от 25.03.2019).

Эксперименты выполнены на 20 крысах-самцах линии Wistar массой 120-150 г, полученных из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург). Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных (заклучение локального этического комитета при ФГБНУ «ИЭМ» №419 от 25.03.2019).

2.1 Аналитические методы

2.1.1 Фотометрические методы

2.1.1.1 Определение *p*-фенилендиаминоксидазной активности церулоплазмينا

Принцип метода основан на окислении *p*-фенилендиамина (*p*-PD) церулоплазмином с образованием окрашенного в фиолетовый цвет продукта конденсации с субстратом [Ravin, 1961]. Метод применим как для определения оксидазной активности Ср в отношении *p*-PD, так и для измерения концентрации Ср. Для проведения анализа данным методом были приготовлены растворы:

1) Раствор А: 0,4 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,5, содержащий свежеприготовленный 0,5 % дигидрохлорид *p*-PD;

2) Раствор В: 0,5% водный раствор NaN₃.

Схема реакции: к 1,58 мл раствора А добавляли 0,02 мл сыворотки крови человека, перемешивали, инкубировали при 37 °С на водяной бане в течение 1 часа, реакцию останавливали добавлением 0,2 мл раствора В. Контрольной пробой служила реакционная смесь с добавленным до инкубации 0,2 мл раствора В, который ингибирует активность Ср. Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре СФ-2000-02 («ОКБ-СПЕКТР», Санкт-Петербург). При умножении на коэффициент 0,875 мг/мл оптической плотности раствора при 530 нм (A_{530}), измеренной против контрольной пробы, был вычислена концентрация Ср в тестируемом образце.

2.1.1.2 Определение ферроксидазной активности церулоплазмينا

Принцип метода основан на способности Ср, проявляя ферроксидазную активность, окислять Fe²⁺, неизрасходованный субстрат реакции измеряли спектрофотометрически за счет образования окрашенного комплекса Fe²⁺ с феррозином [Brown, et al., 2002]. Для проведения анализа данным методом были приготовлены растворы:

1) Раствор А: 0,4 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,5,

2) Раствор В: 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,5, содержащий 367 мкМ соли Мора (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O), 130 мМ тиомочевины, 0,6% Brij-35, 0,01% CHCl₃,

3) Раствор С: 18 мМ водный раствор феррозина,

4) Раствор D: 0,5% водный раствор NaN₃.

Схема реакции: к 1,4 мл раствора А последовательно добавляли 0,3 мл раствора В и 0,02 мл сыворотки крови человека, перемешивали, инкубировали при 37 °С на водяной

бане в течение 10 минут, реакцию останавливали добавлением 0,12 мл раствора С. Контрольной пробой служила реакционная смесь с добавленным до инкубации 0,05 мл раствора D, который ингибирует ферроксидазную активность Ср; в контрольной пробе происходило спонтанное окисление железа. Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре СФ-2000-02 («ОКБ-СПЕКТР», Санкт-Петербург). При умножении на коэффициент 330 мкМ оптической плотности раствора при 564 нм (A_{564}), измеренной против контрольной пробы, была вычислена концентрация ионов Fe^{2+} окисляемых за 1 минуту 1 мл сыворотки.

2.1.1.3 Определение концентрации железа в сыворотке крови

Принцип метода заключается в следующем: в кислой среде железосвязывающие белковые комплексы сыворотки крови диссоциируют, при этом Fe^{3+} восстанавливается до Fe^{2+} в присутствии тиогликолевой кислоты. Ионы двухвалентного железа реагируют с Nitro-PAPS, в результате чего образуется окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию ионов железа в пробе [Yamashita, et al., 1992]. Для маскирования окрашенных комплексов Nitro-PAPS с Cu^{2+} и Zn^{2+} используется хелатирующий агент – тиогликолевая кислота. Для проведения анализа данным методом были приготовлены растворы:

- 1) Раствор А: 0,03 М натрий-ацетатный буфер, 3% додецилсульфат натрия, 4% тиогликолевая кислота,
- 2) Раствор В: 0,03 М натрий-ацетатный буфер, 1 мМ Nitro-PAPS,
- 3) Раствор с известной концентрацией железа: 30 мкМ раствор хлорного железа на 0,1 М соляной кислоте.

Схема реакции: к 1 мл Раствора А добавляли 0,1 мл сыворотки крови (исследуемая проба), раствора с известной концентрацией железа (градуировочная проба) или деионизованной воды (контрольная проба), интенсивно перемешивали и инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре. Далее добавляли 1 мл Раствора В, перемешивали и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Измерение оптической плотности исследуемой и градуировочной пробы проводили против контрольной пробы при 578 нм на полуавтоматическом анализаторе Eclipse (Vital Scientific, Нидерланды) в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см. Концентрацию железа (в мкМ) вычисляли по формуле:

$C = A_{\text{иссл}} / A_{\text{град}} \cdot 30 \text{ мкМ}$, где $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $A_{\text{град}}$ – оптическая плотность градуировочной пробы. Правильность определения концентрации

железа проверяли при помощи контрольных сывороток «Precinorm U & Precipath U» (Roche Diagnostics, Германия).

2.1.1.4 Определение железосвязывающей способности трансферрина

Принцип метода заключается в следующем: при выдерживании сыворотки крови в растворе трехвалентного железа происходит насыщение Tf. После сорбции на карбонате магния избытка несвязанных с Tf ионов железа, концентрацию железа, связанного с Tf, определяли колориметрическим методом [Yamashita, et al., 1992].

Для проведения анализа данным методом были приготовлены растворы:

1) Раствор А: 50 мМ цитрат-бикарбонатный буфер, рН 5,5, содержащий 4,5 мМ раствора хлорного железа.

Схема реакции: к 0,25 мл сыворотки крови добавляли 10 мкл раствора А, перемешивали и оставляли на 10 минут, добавляли 20 мг карбоната магния, несколько раз встряхивали и оставляли еще на 15 минут, снова встряхивали и центрифугировали в течение 15 минут при 3000g. Прозрачную надосадочную жидкость использовали для определения концентрации железа колориметрическим методом.

2.1.1.5 Определение концентрации трансферрина иммунотурбидиметрическим методом

Определение концентрации сывороточного Tf проводили с использованием набора Трансферрин-Витал (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия).

Принцип метода заключается в следующем: Tf в результате реакции преципитации формирует нерастворимые иммунные комплексы антителами коз против Tf человека. Образуется мутная суспензия, оптическая плотность которой определяется фотометрически (двухволновое измерение) и пропорциональна содержанию Tf в пробе. Концентрация Tf определяется по нелинейной градуировочной кривой.

Для проведения анализа данным методом были использованы реагенты набора «Трансферрин-Витал» (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия):

1) Реагент № 1: 70 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 6% полиэтиленгликоль 6000,

2) Реагент №2: 70 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, поликлональные антитела коз против Tf человека (4,5 мМ),

3) Раствор с известной концентрацией Tf: 50 мМ фосфатный буфер, pH 7,4, 150 мМ натрия хлорид, 760 мг/дл Tf человека.

4) Физиологический раствор: 150 мМ натрия хлорид.

Схема реакции: к 450 мкл реагента №1 добавляли 12,5 мкл предварительно разведенной в 10 раз сыворотки крови (исследуемая проба), предварительно разведенного физиологическим раствором в 10, 20, 40, 80, 160 раз раствора с известной концентрацией Tf (градуировочные пробы) или физиологического раствора (контрольная проба). Тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность A_1 при 340 нм (контрольная длина волны 670 нм) против контрольной пробы на автоматическом анализаторе BS-200 (Mindray, Китай). Добавляли 30 мкл реагента №2, перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при 37 °С. Измеряли оптическую плотность A_2 при 340 нм (контрольная длина волны 670 нм) против контрольной пробы. Вычисляли изменение оптической плотности $\Delta A = A_2 - A_1$ для градуировочных проб и строили градуировочный график нелинейной зависимости концентрации Tf от ΔA . Вычисляли изменение оптической плотности $\Delta A = A_2 - A_1$ для исследуемых проб и определяли концентрацию Tf (в мг/дл) по градуировочному графику. Правильность полученных результатов проверяли при помощи контрольных сывороток RANDOX Liquid Specific Protein Control (RANDOX Laboratories, Великобритания).

2.1.1.6 Определение концентрации гемоглобина в крови унифицированным колориметрическим методом

Принцип метода заключается в следующем: под действием феррицианида и цианида калия гемоглобин превращается в цианметгемоглобин, концентрация которого определяется фотометрически [Van Kampen, et al., 1965].

Для проведения анализа данным методом были приготовлены растворы:

1) Раствор А: 1,1 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,3, 0,767 мМ цианид калия, 0,607 мМ феррицианид калия ($K_3[Fe(CN)_6]$), 0,05% додецилсульфат натрия. Перед использованием развели деионизованной водой в 10 раз,

2) Стандартный раствор гемиглобинцианида: 148 г/л гемоглобин,

Схема реакции: к 2,5 мл раствора А добавляли 0,01 мл цельной крови (антикоагулянт K_2 -ЭДТА) или стандартный раствор гемиглобинцианида (148 г/л, Ренам, Россия), инкубировали 5 минут при комнатной температуре, фотометрировали против контрольной пробы (раствор А) при 540 нм на полуавтоматическом анализаторе Genesys (Thermo Fisher Scientific, США) в кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Концентрацию гемоглобина вычисляли по формуле: $C = A_{\text{иссл}} / A_{\text{град}} \cdot 148$ г/л, где $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $A_{\text{град}}$ – оптическая плотность градуировочной пробы. Правильность определения концентрации гемоглобина проверяли при помощи контрольных растворов гемоглобина «Гемоконт» производства ЗАО «Медлакор» и «Диагем К» производства НПО «Ренам».

2.1.1.7 Определение концентрации С-реактивного белка иммунотурбидиметрическим методом

Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) проводили с использованием набора «СРБ-Витал» (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия).

Принцип метода основан на способности С-реактивного белка в результате формировать нерастворимые иммунные комплексы с поликлональными антителами коз против СРБ человека. В результате реакции преципитации образуется мутная суспензия, оптическая плотность которой определяется фотометрически (двухволновое измерение) и зависит от концентрации СРБ в пробе. Концентрация СРБ определяется по нелинейной градуировочной кривой.

Для проведения анализа данным методом были использованы реагенты набора «СРБ-Витал»:

- 1) Реагент № 1: 70 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,43, 6% полиэтиленгликоль, 0,95% азид натрия,
- 2) Реагент № 2: 70 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, 0,95% азид натрия, поликлональные антитела коз против СРБ человека (4,5 мМ),
- 3) Раствор с известной концентрацией СРБ: 70 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,43, 30 мг/дл С-реактивный белок человека,
- 4) Физиологический раствор: 150 мМ натрия хлорид.

К 0,5 мл реагента №1 добавляли 0,03 мл сыворотки крови (исследуемая проба), предварительно разведенного физиологическим раствором в 2, 4, 8, 16 раз раствора с известной концентрацией СРБ (градуировочные пробы) или физиологического раствора (контрольная проба). Тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность A_1 при 340 нм (контрольная длина волны 670 нм) против контрольной пробы на автоматическом анализаторе BS-200 (Mindray, Китай). Добавляли 0,03 мл реагента №2, перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при 37°C. Измеряли оптическую плотность A_2 при 340 нм (контрольная длина волны 670 нм) против контрольной пробы. Вычисляли изменение оптической плотности $\Delta A = A_2 - A_1$ для градуировочных проб и строили градуировочный

график нелинейной зависимости концентрации СРБ от ΔA . Вычисляли изменение оптической плотности $\Delta A = A_2 - A_1$ для исследуемых проб и определяли концентрацию СРБ (в мг/дл) по градуировочному графику. Правильность полученных результатов проверяли при помощи контрольных сывороток RANDOX Liquid Specific Protein Control (RANDOX Laboratories, Великобритания).

2.1.1.8 Определение процентной доли гемоглобина А1с в цельной крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Определение процентной доли гемоглобина А1с было выполнено сотрудниками биохимической лаборатории Диагностического центра №1 на ионообменном высокоэффективном жидкостном хроматографе D-10 с использованием соответствующих реагентов фирмы Bio-Rad Laboratories (США) [Klenk, et al., 1982]. Определение процентной доли А1с в цельной крови проводили согласно инструкции производителя (Hemoglobin A1c Program; кат. № 220-0101).

Принцип метода определения основан на ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии. При элюции проб гемолизированной цельной крови через хроматографическую колонку анализатора D-10 создается запрограммированный буферный градиент возрастающей концентрации ионов, благодаря которому осуществляется разделение форм гемоглобина (А0, А1с, F и других) на основе их ионных взаимодействий с сорбентом в картридже. Затем разделенные гемоглобины проходят через проточную ячейку фотометра, где происходит измерение поглощения при длине волны 415 нм. Результат исследования выдается в виде хроматограммы, на которой четко видны различные пики вариантов гемоглобина. Процентное содержание фракций гемоглобина рассчитывается по площади под графиком соответствующего пика.

2.1.1.9 Определение степени гликирования белков

Принцип метода определения степени гликирования белков с использованием нитротетразолия синего основан на способности фруктозаминов, которые образуются в реакции присоединения сахаров к аминокетогруппам белков, действовать как восстановители в щелочной среде [Фельдкорен, и соавт., 1988]. Под действием восстановителей нитротетразолий синий (НСТ) превращается в окрашенный формазан с максимумом поглощения при 530 нм. По скорости восстановления НСТ определяют концентрацию фруктозамина в пробах. Данный метод был модифицирован нами в связи с

особенностями используемого биологического материала. В связи с тем, что определение концентрации фруктозамина проводилось в пробах, содержащих 3 мг/мл белка, оригинальная методика была модифицирована: увеличено время реакции с 10 до 40 минут.

Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор А: 0,1 М натрий-карбонатный буфер, рН 10,35,
- 2) Раствор В: 3 мМ водный раствор НСТ,
- 3) Раствор с известной концентрацией фруктозамина: 456 мкМ фруктозамина.

Схема проведения анализа:

К 1,2 мл раствора А добавляли 0,1 мл раствора Ср с глюкозой (см. п. 2.3.2) (исследуемые пробы), раствора с известной концентрацией фруктозамина (градуировочная проба) и физиологического раствора (контрольная проба), добавляли 0,5 мл раствора В, перемешивали и инкубировали в течение 20 минут и 60 минут при 37 °С. Через 20 и 60 минут определяли оптическую плотность A_{530} . Фотометрировали против контрольной пробы на спектрофотометре СФ-2000-02 («ОКБ-СПЕКТР», Санкт-Петербург). Вычисляли изменение оптической плотности, измеренной на 20 (A_{20}) и 60 (A_{60}) минуте инкубации: $\Delta A = A_{60} - A_{20}$ и определяли концентрацию фруктозамина (в мг/дл) по градуировочному графику.

2.1.1.10 Определение концентрации HDL-холестерина

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).

Принцип метода заключается в следующем: антитела против LDL связывают все фракции липопротеидов, кроме HDL. Образовавшийся иммунный комплекс не взаимодействует с ферментами, холестеринэстеразой и холестериноксидазой, взаимодействуют только с HDL-холестерином. При гидролизе HDL-холестерина холестеринэстеразой образуется свободный холестерин, который окисляется кислородом воздуха под действием холестериноксидазы с образованием эквимольного количества пероксида водорода. Под действием пероксидазы пероксид водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации HDL-холестерина в анализируемой пробе.

Для проведения анализа данным методом были использованы реагенты набора «HDL-холестерин-Витал»:

1) реагент №1: HEPES (N,N-бис[2-гидроксиэтил-2-аминоэтансульфоная] кислота, 30 мМ; пероксидаза, 2400 Ед/л; 4-аминоантипирин, 0,9 мМ; антитела коз против LDL, 10 мг/л; аскорбатоксидаза, 2700 Ед/л, рН 7,0;

2) реагент 2: HEPES (N,N-бис[2-гидроксиэтил-2-аминоэтансульфоная] кислота, 30 ммоль/л; холестериноксидаза, 20000 Ед/л; N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3,5-диметокси-4-фтороанилин (F-DAOS) 0,8 мМ; холестеринэстераза, 4000 Ед/л, рН 7,0;

3) раствор с известной концентрацией холестерина: 1,23 мМ холестерина.

Схема проведения анализа: к 0,9 мл реагента 1 добавляли 0,01 мл сыворотки крови (исследуемая проба), раствора с известной концентрацией холестерина (градуировочная проба) или деионизованной воды (контрольная проба), пробы тщательно перемешивали, инкубировали при температуре 37°C в течение 5 минут, измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочной пробы (A_1) против контрольной пробы при длине волны 593 нм на полуавтоматическом анализаторе Eclipse (Vital Scientific, Нидерланды) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. К пробам добавляли по 0,3 мл реагента 2, тщательно перемешивали, инкубировали при температуре 37°C в течение 5 минут и повторно измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочной пробы (A_2) против контрольной пробы при длине волны 593 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Концентрацию HDL-холестерина вычисляли по формуле:

$C = A_{\text{иссл}} / A_{\text{град}} \cdot 1,23 \text{ мМ}$, где $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $A_{\text{град}}$ – оптическая плотность градуировочной пробы. Правильность определения концентрации холестерина проверяли при помощи контрольных сывороток «Precinorm U & Precipath U» (Roche Diagnostics, Германия).

2.1.1.11 Определение концентрации LDL-холестерина

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).

Принцип метода заключается в следующем: при добавлении к исследуемому образцу реагента № 1 образуется комплекс, который защищает LDL-холестерин от ферментов – холестеринэстеразы и холестериноксидазы, взаимодействующих с

остальными фракциями липопротеидов. Образующийся в ходе реакции пероксид водорода разрушается каталазой. При добавлении реагента № 2 происходит высвобождение LDL-холестерина из комплекса; натрия азид инактивирует каталазу. При гидролизе оставшегося в растворе LDL-холестерина холестеринэстеразой образуется свободный холестерин, который окисляется кислородом воздуха под действием холестериноксидазы с образованием эквимольного количества пероксида водорода. Под действием пероксидазы пероксид водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации LDL-холестерина в анализируемой пробе.

Для проведения анализа данным методом были использованы реагенты набора «HDL-холестерин-Витал»:

1) реагент №1: HEPES (N,N-бис[2-гидроксиэтил-2-аминоэтансульфоновая] кислота, 25 мМ; холестериноксидаза, 5000 Ед/л; холестеринэстераза, 5000 Ед/л; N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3,5-диметоксианилин, HDAOS, 0,64 мМ; каталаза, 1000000 Ед/л; аскорбатоксидаза, 5 Ед/л, рН 6,8;

2) реагент 2: HEPES (N,N-бис[2-гидроксиэтил-2-аминоэтансульфоновая] кислота, 25 мМ; пероксидаза, 20000 Ед/л; 4-аминоантипирин, 0,9 мМ; натрия азид, 0,095%, рН 7,0;

3) раствор с известной концентрацией холестерина: 2,57 мМ холестерина.

Схема проведения анализа: к 0,9 мл реагента №1 добавляли 0,01 мл сыворотки крови (исследуемая проба), раствора с известной концентрацией холестерина (градуировочная проба) или деионизованной воды (контрольная проба), пробы тщательно перемешивали, инкубировали при температуре 37°C в течение 5 минут, измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочной пробы (A_1) против контрольной пробы при длине волны 593 нм на полуавтоматическом анализаторе Eclipse (Vital Scientific, Нидерланды) в кювете с длиной оптического пути 10 мм. К пробам добавляли по 0,3 мл реагента №2, тщательно перемешивали, инкубировали при температуре 37°C в течение 5 минут и повторно измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочной пробы (A_2) против контрольной пробы при длине волны 593 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Концентрацию LDL-холестерина вычисляли по формуле:

$C = A_{\text{иссл}} / A_{\text{град}} \cdot 2,57 \text{ мМ}$, где $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $A_{\text{град}}$ – оптическая плотность градуировочной пробы. Правильность определения концентрации холестерина проверяли при помощи контрольных сывороток «Precinorm U & Precipath U» (Roche Diagnostics, Германия).

2.1.1.12 Определение концентрации меди в сыворотке крови

Принцип метода заключается в следующем: ионы меди образуют с diBr-PAESA окрашенное соединение, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации меди в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 578 нм [Abe, et al., 1989]. Метод был модифицирован в связи с использованием биологического материала для проведения анализа.

Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор ТХУ: 10% трихлоруксусная кислота,
- 2) Раствор А: 200 мМ натрий-ацетатный буфер, рН 5,0, 0,02 мМ diBr-PAESA, 15 мМ натрия додецилсульфат,
- 3) раствор с известной концентрацией меди: 31,5 мкМ сульфат меди.

Схема проведения анализа:

К 200 мкл сыворотки крови (исследуемая проба), раствора с известной концентрацией меди (градуировочная проба) или деионизованной воды (контрольная проба) добавляли 200 мкл раствора ТХУ, несколько раз энергично встряхивали, центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут, отбирали надосадочную жидкость. К 1 мл раствора А добавляли 0,1 мл соответствующей надосадочной жидкости (исследуемая проба, градуировочная проба, контрольная проба), пробы тщательно перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут, измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочной пробы (А) против контрольной пробы при длине волны 578 нм на полуавтоматическом анализаторе Eclipse (Vital Scientific, Нидерланды) в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Концентрацию меди вычисляли по формуле:

$C = A_{\text{иссл}} / A_{\text{град}} \cdot 31,4 \text{ мкМ}$, где $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $A_{\text{град}}$ – оптическая плотность градуировочной пробы. Правильность определения концентрации железа проверяли при помощи контрольных сывороток «Precinorm U & Precipath U» (Roche Diagnostics, Германия).

2.1.1.13 Определение концентрации глюкозы в сыворотке крови

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).

Принцип метода заключается в следующем: при окислении β -D-глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы образуется эквимольное количество перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты в присутствии фенола с образованием окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 510 (490-540) нм.

Для проведения анализа данным методом были использованы реагенты набора «ГЛЮКОЗА-Витал»:

1) реагент 1 - реагент 1: монореагент (фосфатный буфер, pH 7,8, 100 ммоль/л; фенол, 11 ммоль/л; глюкозооксидаза, 3000 ед/л; пероксидаза, 180 ед/л; 4-аминоантипирин, 0,016 ммоль/л)

2) калибратор: калибровочный раствор глюкозы, 10 ммоль/л, в 0,15% растворе бензойной кислоты.

Схема проведения анализа: к 2 мл реагента №1 добавляли 0,01 мл сыворотки крови (исследуемая проба), раствора с концентрацией глюкозы 10 ммоль/л (градуировочная проба) или деионизованной воды (контрольная проба), пробы тщательно перемешивали, инкубировали при температуре 37°C в течение 10 минут, измеряли величину оптической плотности исследуемой ($A_{\text{иссл}}$) и градуировочной пробы ($A_{\text{град}}$) против контрольной пробы при длине волны 510 нм на полуавтоматическом анализаторе Eclipse (Vital Scientific, Нидерланды) в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Концентрацию глюкозы вычисляли по формуле:

$C = A_{\text{иссл}} / A_{\text{град}} \cdot 10 \text{ мМ}$, где $A_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $A_{\text{град}}$ – оптическая плотность градуировочной пробы. Правильность определения концентрации глюкозы проверяли при помощи контрольных сывороток «Precinorm U & Precipath U» (Roche Diagnostics, Германия).

2.1.1.14 Определение концентрации свободных SH-групп

Принцип метода основан на реакции взаимодействия SH-групп с реактивом Элмана. В ходе реакции происходит разрыв дисульфидной связи в 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоте (ДТНБ) с образованием 2-нитро-5-тиобензойной кислоты, которая легко переходит в хиноидную форму при щелочных pH и имеет ярко-жёлтую окраску, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации свободных SH-

групп в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 412 нм [Hu, 1994].

Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор ТХУ: 50% трихлоруксусная кислота,
- 2) Раствор А: 400 мМ трис-НСl буфер, рН 8,9,
- 3) Раствор ДНТБ: 10 мМ 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота в этаноле,
- 4) Растворы с известной концентрацией SH-групп: водные растворы глутатиона в диапазоне концентраций 10-1000 мкМ.

Схема подготовки проб к анализу:

К 200 мкл сыворотки крови (антикоагулянт ЭДТА) (исследуемая проба), растворов с известной концентрацией SH-групп (градуировочные пробы) или деионизованной воды (контрольная проба) добавляли 25 мкл раствора ТХУ, несколько раз энергично встряхивали, центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут, отбирали надосадочную жидкость.

Схема проведения анализа:

В лунки 96-луночного планшета вносили 200 мкл раствора А и 100 мкл надосадочной жидкости (исследуемая проба, градуировочные пробы, контрольная проба), перемешивали и измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочных проб (A_1) против контрольной пробы при длине волны 412 нм на планшетном фотометре («ClarioStar», BMG Labtech, Германия). К пробам добавляли 5,2 мкл раствора ДНТБ, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут, повторно измеряли величину оптической плотности (A_2). Строили градуировочный график линейной зависимости концентрации SH-групп в градуировочных пробах от величины изменения оптической плотности ΔA , вычисляемой по формуле $\Delta A = A_2 - A_1$. По градуировочному графику определяли концентрацию SH-групп в исследуемых пробах (в мкМ).

2.1.1.15 Определение активности глутатионпероксидазы

Принцип метода заключается в следующем: глутатионпероксидаза восстанавливает гидроперекись, при этом происходит окисление восстановленного глутатиона, что сопровождается уменьшением свободных SH-групп [Гаврилова и Хмара, 1986]. Концентрацию свободных SH-групп определяют по реакции взаимодействия с реактивом Элмана, содержащем 5,5'-дитиобис-2-нитробензойную кислоту (ДТНБ) (см. п. 2.1.1.14).

Скорость уменьшения концентрации свободных SH-групп прямопропорциональна активности глутатионпероксидазы. Активность глутатионпероксидазы нормируют на концентрацию гемоглобина (см. п. 2.1.1.6).

Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор ТХУ: 50% трихлоруксусная кислота,
- 2) Раствор А: 400 мМ трис-НСl буфер, рН 8,9,
- 3) Раствор В (готовится в день использования): 167 мМ трис, 0,83 мМ ЭДТА, 1 мМ NaN₃, 0,42 мМ восстановленный глутатион, рН 8,0,
- 4) Раствор С (готовится непосредственно перед использованием): 0,18% трет-бутилгидропероксид,
- 5) Раствор ДНТБ: 10 мМ 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота в этаноле,
- 6) Растворы с известной концентрацией SH-групп: водные растворы восстановленного глутатиона в диапазоне концентраций 10-1000 мкМ.

Схема приготовления гемолизата:

Цельную кровь (антикоагулянт ЭДТА) центрифугировали при 400 g в течение 15 минут, отбирали эритромассу. К полученному объему эритромассы добавляли 10-кратный объем дистиллированной воды, тщательно перемешивали до полного лизирования эритроцитов.

Схема подготовки проб к анализу:

Последовательно вносили в пробирки: 600 мкл раствора В, 25 мкл гемолизата (исследуемая проба), растворов с известной концентрацией SH-групп (градуировочные пробы) или дистиллированной воды (контрольная проба), 5 мкл раствора С. Содержимое пробирок перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, добавляли 60 мкл раствора ТХУ, несколько раз энергично встряхивали, центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут, отбирали надосадочную жидкость.

Схема проведения анализа:

В лунки 96-луночного планшета вносили 200 мкл раствора А и 100 мкл надосадочной жидкости (исследуемая проба, градуировочные пробы, контрольная проба), перемешивали и измеряли величину оптической плотности исследуемой и градуировочных проб (A_1) против контрольной пробы при длине волны 412 нм на планшетном фотометре («ClarioStar», BMG Labtech, Германия). К пробам добавляли 5,2 мкл раствора ДНТБ, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут, повторно измеряли величину оптической плотности (A_2). Строили градуировочный график линейной зависимости концентрации SH-групп в градуировочных пробах от величины изменения оптической плотности ΔA , вычисляемой

по формуле $\Delta A = A_1 - A_2$. По градуировочному графику определяли концентрацию SH-групп в исследуемых пробах (в мкМ).

Расчет активности глутатионпероксидазы с нормированием на концентрацию гемоглобина проводили по формуле:

$$A_{GPH} = \frac{\Delta A}{t} \times F / Hb ,$$

где A_{GPH} – активность глутатионпероксидазы (мМ/ мин/ г Hb); ΔA – изменение оптической плотности при определении концентрации SH-групп (ед. опт. плот.); Hb – количество гемоглобина в гемолизате, взятом для анализа (г); t – время проведения реакции (мин); F – фактор пересчета, рассчитываемый по формуле:

$$F = \frac{V \times K}{e \times v},$$

где V – конечный объем измеряемой пробы, мл; v – объем добавленного образца, мл; e – коэффициент молярной экстинкции для окисленного перекисью глутатиона в условиях определения, $13600 \text{ моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; K – коэффициент пересчета активности глутатионпероксидазы, учитывающий условия определения.

2.1.1.16 Определение активности глутатион-S-трансферазы

Принцип метода заключается в следующем: глутатион-S-трансфераза катализирует реакцию конъюгации восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Скорость образования продукта реакции прямопропорциональна активности глутатион-S-трансферазы и измеряется фотометрически при длине волны 340 (350) нм [Habig, et al., 1974]. Активность глутатион-S-трансферазы нормируют на концентрацию гемоглобина (см. п. 2.1.1.6).

Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор ТХУ: 50% трихлоруксусная кислота,
- 2) Раствор А (готовится в день использования): 100 mM K_2HPO_4 , 1,87 mM восстановленный глутатион, pH 6,5,
- 3) Раствор В (готовится непосредственно перед использованием): 50 mM 1-хлор-2,4-динитробензол в ацетоне.

Схема приготовления гемолизата:

Цельную кровь (антикоагулянт ЭДТА) центрифугировали при 400 g в течение 15 минут, отбирали эритромассу. К полученному объему эритромассы добавляли 10-кратный

объем дистиллированной воды, тщательно перемешивали до полного лизирования эритроцитов.

Схема проведения анализа:

Последовательно вносили в пробирки: 525 мкл раствора А, 10 мкл раствора В, 65 мкл гемолизата (исследуемая проба) или дистиллированной воды (контрольная проба). Содержимое пробирок перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, добавляли 75 мкл раствора ТХУ, несколько раз энергично встряхивали, центрифугировали при 3000 g в течение 15 минут, отбирали надосадочную жидкость.

В лунки 96-луночного планшета вносили 200 мкл надосадочной жидкости и измеряли величину оптической плотности исследуемой пробы (А) против контрольной при длине волны 350 нм на планшетном фотометре («ClarioStar», BMG Labtech, Германия). Расчет активности глутатионпероксидазы с нормированием на концентрацию гемоглобина проводили по формуле:

$$A_{GST} = \frac{A}{t} \times F / Hb,$$

где A_{GST} – активность глутатион-S-трансферазы (мМ/ мин/ г Hb); А – оптическая плотность исследуемой пробы (ед. опт. плот.); Hb – количество гемоглобина в гемолизате, взятом для анализа (г), t – время проведения реакции (мин), F – фактор пересчета, рассчитываемый по формуле:

$$F = \frac{V \times K}{e \times v},$$

где V – конечный объем измеряемой пробы; мл; v – объем добавленного образца; мл; e – коэффициент молярной экстинкции продукта конъюгации глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом в условиях определения, 9600 моль¹×см⁻¹; K – коэффициент пересчета активности глутатион-S-трансферазы, учитывающий условия определения.

2.1.2 Электрофоретические методы

2.1.2.1 Электрофоретическое разделение нативных белков в щелочной системе

Принцип метода заключается в следующем: молекулы белка обладают зарядом, величина и знак которого определяются аминокислотным составом белка и pH среды. Под влиянием внешнего электрического поля заряженные молекулы передвигаются в растворе к противоположно заряженному полюсу. Скорость перемещения белковых частиц пропорциональна величине их заряда и обратно пропорциональна размеру частиц и степени их гидратации [Davis, 1964].

Для проведения электрофоретического разделения (ЭФ) нативных белков с $pI < 7$ были приготовлены растворы:

- 1) Раствор для разделяющего полиакриламидного геля (ПААГ): 380 мМ едкого NaCl , pH 8,9, 7,5% акриламид (соотношение акриламид: N,N' - метиленабисакриламид - 30:0,8), 0,1% персульфат аммония $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$, 0,1% N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД),
- 2) Раствор для концентрирующего ПААГ: 126 мМ трис- HCl , pH 6,8, 5% акриламид (соотношение акриламид- $N N'$ - метиленабисакриламид - 30:0,8), 0,1% персульфат аммония, 0,1% ТЕМЕД,
- 3) Электродный буфер: 5 мМ трис, 38 мМ глицин, pH 8,3.
- 4) Буфер для проб: 62,5 мМ трис- HCl , pH 6,8, 50% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий,
- 5) Раствор для окрашивания: 0,5% Кумасси бриллиантовый синий R-250, 25% этанол, 10% уксусная кислота,
- 6) Раствор для обесцвечивания фона: 25% этанол, 10% уксусная кислота.

Подготовка образцов для проведения электрофоретического разделения белков сыворотки крови:

К 16 мкл буфера для проб добавляли 4 мкл образца сыворотки крови, содержащего 30-50 мкг белка, перемешивали и вносили в лунку ПААГ.

Схема проведения опыта: ЭФ белков в ПААГ проводили в течение 2,5-3 часов при комнатной температуре 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.

Окрашивание белков после разделения в ПААГ проводили путем выдерживания геля в растворе для окрашивания в течение 30 минут на шейкере (50-90 об/мин), отмывку геля от избытка краски проводили путем выдерживания в растворе для обесцвечивания фона на шейкере (50-90 об/мин).

2.1.2.2 Электрофорез в щелочной системе в присутствии додецилсульфата натрия

Принцип метода аналогичен принципу метода по п. 2.1.2.1, за исключением присутствия в среде додецилсульфатата натрия (SDS) – добавление которого позволяет фракционировать белки исключительно по молекулярной массе.

Для проведения электрофоретического разделения белков в денатурирующих условиях в присутствии SDS [Laemmli, et al., 1970] были приготовлены растворы:

- 1) Раствор для разделяющего полиакриламидного геля (ПААГ): 380 мМ трис-НСl, рН 8,9, 7,5% акриламид (соотношение акриламид- N N'- метиленбисакриламид - 30:0,8), 0,5 % глицерол, 0,1 % SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,1% ТЕМЕД,
- 2) Раствор для концентрирующего ПААГ: 126 мМ трис-НСl, рН 6,8, 5% акриламид (соотношение акриламид- N N'- метиленбисакриламид - 30:0,8), 0,5 % глицерол, 0,1 % SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,1% ТЕМЕД,
- 3) Электродный буфер: 16,5 мМ трис, 128 мМ глицин, рН 8,3, 0,1 % SDS,
- 4) Буфер для проб: 125 мМ трис-НСl, рН 6,8, 2 % SDS, 0,1 % 2-меркаптоэтанол, 0,001 % бромфеноловый синий, 50 % глицерин,
- 5) Раствор для фиксации: 50% этанол, 10% уксусная кислота,
- 6) Раствор для окрашивания: 0,5% Кумасси бриллиантовый синий R-250, 25% этанол, 10% уксусная кислота,
- 7) Раствор для обесцвечивания фона: 25% этанол, 10% уксусная кислота.

Подготовка образцов для проведения электрофоретического разделения белков сыворотки крови:

К 16 мкл буфера для проб добавляли 4 мкл образца сыворотки крови, содержащего 1-50 мкг белка, пробу нагревали на водяной бане при 98°C в течение 1 минуты, перемешивали и вносили в лунку ПААГ.

Схема проведения ЭФ белков:

ЭФ белков в ПААГ проводили в течение 2,5-3 часов при комнатной температуре 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.

Перед окрашиванием гель отмывали от SDS в растворе для фиксации в течение ночи. Окрашивание белков проводила так же, как и в пункте 2.1.2.1.

2.1.2.3 Выявление оксидазной активности церулоплазмينا после электрофореза

Принцип метода основан на способности Ср окислять *o*-дианизидин. Специфическую оксидазную активность Ср выявляли путем окрашивания полиакриламидных гелей раствором *o*-дианизидина [Owen, et al., 1961].

Для выявления оксидазной активности церулоплазмينا в ПААГ готовили следующие растворы:

- 1) Окрашивающий раствор: 0,08 М натрий ацетат-уксусная кислота, рН 5,0, 10% этанол, 0,025% раствор *o*-дианизидина,

- 2) 0,025% раствор *o*-дианизидина: 1 г/дл *o*-дианизидин, 30% этанол, 0,1 М НСl.

Схема реакции:

ПААГ после ЭФ помещали в окрашивающий раствор и инкубировали при 37°C в течение ночи. Оценку оксидазной активности Ср проводили полуколичественно с помощью сканирования геля.

2.1.3 Иммунохимические методы

2.1.3.1 Определение концентрации церулоплазмينا методом ракетного иммуноэлектрофореза

Принцип метода основан на реакции преципитации в агарозном геле под действием электрического тока между растворимыми белками и специфическими по отношению к ним антителами.

Для проведения ракетного иммуноэлектрофореза Ср [Laurell, 1966] были приготовлены следующие растворы:

- 1) Буфер 1: 13 г/л натрия барбитал, 2,07 г/л барбитал; барбитал растворяли в 1 л доведенной до кипения дистиллированной воды при перемешивании,
- 2) Буфер 2: 56,2 г/л глицин, 45,2 г/л трис,
- 3) Буфер 3: 500 мл буфера 1, 500 мл буфера 2,
- 4) Раствор агарозы с антителами: 1% агароза на буфере 3, 0,1 мг/мл антител кролика против Ср человека; добавление антител проводили к расплавленной и охлажденной до 60°C агарозе,
- 5) Раствор Ср с известной концентрацией: водный раствор Ср человека с концентрацией 0,4 мг/мл,
- 6) Физиологический раствор: 150 мМ натрия хлорид,
- 7) Окрашивающий раствор: 0,08 М натрий ацетат-уксусная кислота, рН 5,0, 10% этанол, 0,025% раствор *o*-дианизидина,
- 8) 0,025% раствор *o*-дианизидина: 1 г/дл *o*-дианизидин, 30% этанол, 0,1 М НСl.

Схема проведения анализа:

На уравновешенную стеклянную пластину размером 60×90×1 мм наносили раствор агарозы с антителами в количестве 10 мл (из расчета 0,19 мл агарозы на 1 см² стеклянной пластины), после застывания геля формировали лунки, в которые вносили по 5 мкл разведенных физиологическим раствором в 50 раз образцов сыворотки крови (исследуемые пробы), по 5 мкл разведенного физиологическим раствором в 25, 50, 100 и 150 раз раствора Ср с известной концентрацией (градуировочные пробы).

Иммуноэлектрофорез проводили в течение 17 часов при напряжении 10 В/см. После электрофореза гель отжимали при помощи фильтровальной бумаги слоем 2-3 см, на которую помещали груз (10 г/см^2) на 10 минут. Для проявления ферментативной активности Ср в иммунопреципитатах, стекло с тонкой пленкой геля помещали в окрашивающий раствор и инкубировали при 37°C в течение ночи. Строили градуировочный график зависимости площади пика преципитации (ракеты) от концентрации Ср, выраженной в мкг/мл. По градуировочной кривой определяли концентрацию Ср в исходной пробе.

2.1.3.2 Определение концентрации церулоплазмينا методом радиальной иммунодиффузии по Манчини

Принцип метода основан на реакции преципитации в агарозном геле между радиально диффундирующими антигенами и специфическими по отношению к ним антителами [Mancini, et al, 1965].

Для проведения метода определения концентрации Ср методом радиальной иммунодиффузии по Манчини оригинальная методика была изменена и были приготовлены следующие растворы:

- 1) Буфер 1: 13 г/л натрия барбитал, 2,07 г/л барбитал; барбитал растворяли в 1 л доведенной до кипения дистиллированной воды при перемешивании,
- 2) Буфер 2: 56,2 г/л глицин, 45,2 г/л трис,
- 3) Буфер 3: 500 мл буфера 1, 500 мл буфера 2,
- 4) Раствор агарозы с антителами: 1% агароза на буфере 3, 0,1 мг/мл антител кролика против Ср человека; добавление антител проводили к расплавленной и охлажденной до 60°C агарозе,
- 5) Раствор Ср с известной концентрацией: водный раствор Ср человека с концентрацией 0,4 мг/мл,
- 6) Физиологический раствор: 150 мМ натрия хлорид,

Схема проведения анализа:

На уравновешенную стеклянную пластину размером $60 \times 90 \times 1$ мм наносили раствор агарозы с антителами в количестве 10 мл (из расчета 0.19 мл агарозы на 1 см^2 стеклянной пластины), после застывания геля формировали лунки, в которые вносили по 5 мкл разведенных физиологическим раствором в 50 раз образцов сыворотки крови (исследуемые пробы), по 5 мкл разведенного физиологическим раствором в 25, 50, 100 и 150 раз раствора Ср с известной концентрацией (градуировочные пробы).

Радиальную иммунодиффузию проводили во влажной камере в течение 48 часов при комнатной температуре. Кольца преципитации измеряли на влажной пластине. Строили градуировочный график зависимости площади пика преципитации (кольца преципитации) от концентрации C_p , выраженной в мкг/мл. По градуировочной кривой определяли концентрацию C_p в исходной пробе.

2.1.3.3 Определение концентрации ферритина, церулоплазмينا и трансферрина крысы методом твердофазного иммуноферментного анализа

Принцип метода основан на выявлении антигенов, адсорбированных в лунках полистирольного планшета, с помощью соответствующих антител, конъюгированных с ферментативной меткой (пероксидазой хрена) [Gaastra, 1984].

Для проведения анализа данным методом были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор А: 0,1 М натрий-карбонатный буфер, рН 9,4,
- 2) Раствор В: 0,02 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид, 0,05% tween 20,
- 3) Раствор С: 0,02 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид, 0,05% tween 20, 1% бычий сывороточный альбумин,
- 4) Раствор D: 0,02 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид, 0,05% tween 20, 0,2% бычий сывороточный альбумин, меченные пероксидазой антитела кролика к ферритину (C_p или Tf) крысы в концентрации 16 мкг/мл.
- 5) Раствор E: 0,02 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид, 0,05% tween 20, 0,2% бычий сывороточный альбумин, антитела осла к антителам кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена в концентрации 400 нг/мл.
- 6) Раствор F: 0,7 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), 8% ацетонитрил, 0,4 М натрий-ацетатный буфер, рН 5.5, 0,025% пероксид водорода. Схема приготовления раствора: к навеске ТМБ добавляли ацетонитрил, перемешивали до полного растворения, последовательно добавляли равный объем дистиллированной воды, натрий-ацетатный буфер, непосредственно перед использованием добавляли перекись водорода,
- 7) Останавливающий реакцию реагент: 1 М серная кислота.

Схема проведения анализа:

- 1) Сорбция аффинных антител. В лунки планшета добавляли по 100 мкл растворов аффинных антител (5 мкг/мл) приготовленных на растворе А. Герметично

закрытый планшет липкой пленкой и инкубировали в течение ночи при 2-8°C, утром проводили двухкратную отмывку раствором В.

2) Блокировка. В лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора С, инкубировали в течение 1 часа при 37°C в термошейкере (300 об/мин), проводили трехкратную отмывку раствором В.

3) Сорбция антигенов. В лунки планшета добавляли по 100 мкл растворов ферритина крысы с концентрациями 1, 5, 15, 30 мг/дл или растворов Ср крысы с концентрациями 1, 5, 25, 50, 100 мг/дл или растворов Tf крысы с концентрациями 1, 5, 25, 50, 200 и 400 мг/дл, приготовленных на растворе В (градуировочные пробы), а также по 100 мкл сыворотки крови крысы (исследуемые пробы предварительно разбавляли от 10 до 500 раз). Герметично закрытый планшет инкубировали в течение 1 часа при 37°C в термошейкере (300 об/мин), проводили трехкратную отмывку раствором В.

4) Добавление специфических антител, меченных пероксидазой из корней хрена. В лунки планшета добавляли по 100 мкл соответствующего антигену раствора D, инкубировали в течение 1 часа при 37°C в термошейкере (300 об/мин), проводили трехкратную отмывку раствором В.

5) Окрашивание. В лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора F, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, добавляли 100 мкл останавливающего реакцию реагента. Измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм на планшетном фотометре («ClarioStar», BMG Labtech, Германия) для исследуемых проб и градуировочных проб и строили градуировочный график нелинейной (логарифмической) зависимости концентрации ферритина (Ср либо Tf) от оптической плотности. С помощью полученного уравнения $A_{450} = k \lg[\text{аналит}] + b$ вычисляли и определяли концентрацию аналита в исследуемых пробах (в мг/дл) по градуировочному графику.

2.1.4 Определение взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека методом поверхностного плазмонного резонанса

Принцип метода основан на образовании межмолекулярных комплексов на границе раздела двух сред, которое сопровождается изменением показателя преломления одной из них, что приводит к модуляции параметров поверхностного плазмонного резонанса, регистрируемой детектором [Schasfoort, et al., 2008].

Для проведения анализа данным методом были приготовлены следующие растворы:

- 1) Смесь А: водный раствор 0,2 М N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимида, 0,2 М N-гидроксисукцинимиды;
- 2) Буфер А: 10 мМ натрий-ацетат, рН 5,0;
- 3) Буфер В: 1 М этаноламин, рН 8,5;
- 4) Буфер С: 10 мМ HEPES-NaOH, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 0,05% полиоксиэтилен-сорбитан;
- 5) Буфер D: 10 мМ HEPES-NaOH, рН 7,5, 1 М NaCl, 0,05% полиоксиэтилен-сорбитан, 1 М NaCl.

Измерения взаимодействия белков проводили с помощью оптического сенсора, основанного на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), при 25°C с использованием чипов с карбоксиметилированным декстраном (CM5) на приборе «Biacore X100» с двойной проточной ячейкой («GE-Healthcare», США). Карбоксильные группы чипа активировали смесью А. После активации инъецировали раствор Ср (20 мкг/мл) в буфере А со скоростью 5 мкл/мин в течение 12 минут. Блокировку свободных групп чипа проводили буфером В. 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 С инъецировали возрастающие концентрации аналита (А) – апо-формы Tf (1,6–51,3 мкМ). Каждый эксперимент состоял из 4 стадий:

- 1) инъекция буфера С в течение 1 мин;
- 2) инъекция аналита в течение 1 мин;
- 3) стадия диссоциации в течение 5 мин (промывка буфером С);
- 4) регенерация с помощью буфера D в течение 1,5 мин.

Часть проточной ячейки без иммобилизованного Ср использовалась как контрольная для определения неспецифического связывания смеси А с чипом (<2% от R_{max}). В итоге для каждой концентрации А контрольная кривая связывания вычиталась из соответствующей кривой связывания с иммобилизованным Ср. Равновесная константа диссоциации K_D комплекса Ср-А была определена по зависимости установившегося значения ответа (RU) от концентрации А, при этом данные соответствовали уравнению Ленгмюра для модели одноцентрового связывания:

$$\frac{R_{eq}}{R_{max}} = \frac{[A]}{[A] + K_D},$$

где R_{eq} – ответ при достижении равновесия, RU; R_{max} – ответ при насыщении поверхности аналитом, RU.

Для доказательства того, что использованная система способна детектировать взаимодействия в качестве аналита в таком же диапазоне концентраций нами был использован гомолог Tf, лактоферрин человека – положительный контроль.

Кинетические параметры (k_a – константа скорости ассоциации, k_d – константа скорости диссоциации, K_D – равновесная константа диссоциации, R_{max} – максимальная связывающая способность поверхности чипа) были рассчитаны с использованием модели связывания 1:1. Значение U является оценкой уникальности рассчитанных значений для констант скорости и R_{max} . Если параметры коррелируют, процедура расчета может определять их относительные, но не абсолютные значения (например, характеристика аффинности позволяет судить об относительном, но не абсолютном значении константы скорости).

Значение U выше 25 указывает, что абсолютные значения для двух или более параметров (константы скорости и R_{max}) коррелируют и не могут быть определены. Если значение U ниже 15, то значения кинетических параметров не коррелируют значительно.

2.1.5 Определение взаимодействия церулоплазмينا и трансферрина человека методом равновесной гель-фильтрации

Принцип метода основан на разделении смеси взаимодействующих веществ путем гель-фильтрации через различные пористые гели, уравновешенные постоянной концентрацией одного из веществ [Hagel, 2001]. В случае отсутствия взаимодействия в профиле элюции будет наблюдаться единичный пик одного вещества, а фоновая концентрация второго, которым был уравновешен сорбент, не изменится. В том случае, если вещества взаимодействуют, то они выйдут единичным пиком, соответствующим их комплексу, однако позже для второго вещества будет наблюдаться инвертированный пик (провал) вследствие того, что оно участвовало во взаимодействии.

Для определения взаимодействия Ср и Tf человека были приготовлены следующие растворы:

- 1) Буфер А: 100 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7,4, 51,3 мкМ апо-формы Tf,
- 2) Буфер В: 100 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7,4.

Колонка с Sephacryl S-200 HR (20×1 см) была уравновешена буфером А. Образец в объеме 0,2 мл, содержащий 30 мкМ Ср и 51,3 мкМ Tf, нанесли на колонку и элюировали со скоростью 0,1 мл/мин буфером А. Во фракциях элюата объемом 0,5 мл регистрировали поглощение при длинах волн 280 нм (длина оптического пути 1 мм) и 610 нм (длина

оптического пути 1 см), используя в качестве контроля буфер В. Фракции (10 мкл) исследовали с помощью диск-электрофореза в щелочной среде (см. п. 2.1.2.2), после чего Cr-содержащие зоны окрашивались о-дианизидином (см. п. 2.1.2.3). Для доказательства того, что использованная система способна детектировать взаимодействия в качестве положительного контроля колонка была уравновешена 51,3 мкМ лактоферрином человека.

2.2 Препаративные методы

2.2.1 Получение сыворотки из цельной крови человека

Сыворотка крови была получена центрифугированием цельной крови в центрифуге (ELMI Ltd., Латвия) при 3000 g в течение 15 минут, отобрана в пробирки типа эппендорф (Sarsted Co., США) и использована либо сразу после получения, либо заморожена и хранилась при -20°C.

2.2.2 Получение очищенных белковых препаратов

2.2.2.1 Выделение ферритина крысы

Выделение ферритина из печени крысы проводили по методу [Craig, et al., 1985].

Для проведения выделения были приготовлен буфер А: 0,02 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид.

Для выделения ферритина крысы использовали 100 г печени крысы, хранившейся при -70°C сразу после диссекции; работы проводили после полной разморозки на водяной бане при 37°C. Печень крысы гомогенизировали в 2 объемах дистиллированной воды. Гомогенат быстро нагревали до 70°C при непрерывном перемешивании в течение 5 минут, сразу же охлаждали до 4°C и центрифугировали при 1500 g в течение 20 минут для осаждения денатурированного белка. Надосадочную жидкость декантировали, ферритин осаждали путем насыщения 50% сульфатом аммония и перемешиванием в течение ночи. Полученный после центрифугирования при 1500 g в течение 30 минут осадок ресуспендировали в буфере А и диализовали в течение 24 часов против 4 литров буфера А с однократной заменой буфера. После диализа раствор центрифугировали при 30000 g в течение 30 минут. Полученную надосадочную жидкость центрифугировали при 100000 g в течение 2 часов. Полученный осадок ресуспендировали в буфере А, пропускали через колонку 15×2,5 см с BioGel-1,5m (BioRad), предварительно уравновешенную буфером А. Окрашенные фракции собирали, измеряли поглощение при 280 нм и проводили

определение концентрации железа. Объединенные фракции концентрировали на ультрафильтрационном устройстве Amicon, оборудованном мембраной PM30. Концентрированный ферритин повторно пропускали через колонку 15×2,5 см с BioGel-1,5m (BioRad), предварительно уравновешенную буфером А. Чистоту выделенного белка определяли методом электрофореза в щелочной среде в присутствии SDS.

2.2.2.2 Выделение церулоплазмينا крысы и человека

Выделение Ср крысы и человека проводили по модифицированному методу [Соколов, и соавт., 2012].

Для проведения выделения были приготовлены следующие растворы:

- 1) Буфер А: 0,02 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид;
- 2) Буфер В: 40 мМ триэтанолламин-НСl, рН 7,4;
- 3) Буфер С: 20 мМ триэтанолламин-НСl, рН 7,4.

Для выделения Ср крыс использовали сыворотку крови, собранную у животных под эфирным наркозом. Сыворотку крови получали путем центрифугирования при 450g. Работу проводили в холодной комнате (2-8°C) и все растворы хранили на льду. К 500 мл сыворотки добавляли сухую 6-аминокапроновую кислоту до конечной концентрации 2 мМ. Модифицированную сыворотку наносили со скоростью 10 мл/мин на колонку 15×2,5 см со смолой UNO-Sphere Q (Bio-Rad), предварительно уравновешенную буфером А. Отмывку от балластных белков выполняли последовательно 3-мя объемами (120 мл) буфера А и буфера В до $A_{280} < 0,005$. После отмывки колонку с нанесенной сывороткой крови крысы выдерживали в течение ночи при 2-8°C. Перед элюцией колонку устанавливали в хроматограф Bio-Rad DuoFlow 20, используемые для элюции растворы охлаждали до температуры 2-8°C. Элюцию белков проводили со скоростью 2 мл/мин по 200 мл линейным градиентом натрия хлорида от 0 до 0,5 М в буфере В. Окрашенные в синий цвет фракции объединяли, разбавляли в 10 раз буфером С и наносили со скоростью 5 мл/мин на колонку 20×0,5 см с неомицин-агарозой, предварительно уравновешенную буфером В. Отмывку от балластных белков выполняли 3-мя объемами (30 мл) буфера В до $A_{280} < 0,005$. Элюцию белков проводили со скоростью 2 мл/мин по 200 мл линейным градиентом кальция хлорида от 0 до 100 мМ в буфере В. Окрашенные в синий цвет фракции были объединены и сконцентрированы до 5 мл в ультрафильтрационных центрифужных концентраторах VivaSpin 20 с диаметром пор 30 кДа (Sartorius) путем центрифугирования при 7000 g при 2-8°C в течение 10 минут, дважды промыты буфером В, а затем трижды промыты буфером А.

Полученный препарат Ср крысы (260 мг) объемом 5 мл с критерием чистоты $A_{610}/A_{280}=0,054$ был аликвотирован по 0,2 мл и хранился до использования при -80°C . По аналогичному методу выделяли Ср человека, используя в качестве источника цитратную плазму крови. Из 600 мл плазмы было получено 316 мг Ср человека в объеме 6 мл. Препарат с критерием чистоты $A_{610}/A_{280}=0,051$ был аликвотирован по 0,2 мл и хранился до использования при -80°C .

2.2.2.3 Выделение трансферрина крысы и человека

Выделение Tf крысы и человека проводили по модифицированному методу [Baker, et al., 1968].

Для проведения анализа были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор А: 100 мМ цитрат-бикарбонатный буфер, рН 5,5; 30 мМ хлорид железа,
- 2) Буфер В: 5 мМ трис-НСl, рН 8,4,
- 3) Буфер С: 0,05 М натрий ацетатный буфером рН 5,5.
- 4) Буфер D: 0,02 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид.

К 50 мл сыворотки крови крысы либо человека добавляли 0,2 мл раствора А для насыщения Tf, перемешивали в течение 10 минут, добавляли 22,1 г сульфата аммония для 70% насыщения, перемешивали до полного растворения, выдерживали в течение ночи при $2-8^{\circ}\text{C}$, центрифугировали при 15000 g в течение 30 минут при $2-8^{\circ}\text{C}$. Полученный осадок растворяли в минимальном объеме деионизованной воды, диализовали в течение ночи против буфера В с трехкратной сменой буфера. Белковую смесь разводили 10 кратным объемом (~500 мл) буфера В, наносили на предварительно уравновешенную буфером В колонку DEAE-Sephadex A-50 (1,5×5 см), элюцию проводили линейным градиентом по 25 мл натрия хлорида от 0,05 до 0,5 М. Окрашенные фракции собирали, добавляли сульфат аммония для 70% насыщения, перемешивали до полного растворения, выдерживали в течение ночи при $2-8^{\circ}\text{C}$, центрифугировали при 15000 g в течение 30 минут при $2-8^{\circ}\text{C}$. Осадок растворяли в минимальном объеме деионизованной воды, диализовали в течение ночи против буфера С с трехкратной сменой буфера. Белковую смесь разводили 10 кратным объемом (~500 мл) буфера В, наносили на предварительно уравновешенную буфером С колонку Sephadex G-200 (1,5×5 см), элюцию проводили линейным градиентом натрий-ацетатного буфера от 0,05 до 0,5 М.

Выделенные фракции, представленные одной полосой 80 кДа при электрофоретическом разделении нативных белков в щелочной системе, были объединены и сконцентрированы в ультрафильтрационных центрифужных

концентраторах Vivaspin 500 с диаметром пор 30 кДа (Сарториус, Россия) путем центрифугирования при 7000 g при 2-8°C в течение 10 минут, дважды промыты буфером D.

2.2.2.4 Выделение лактоферрина человека

Лактоферрин (Lf) из грудного молока человека был выделен после двухэтапной очистки [Zakharova, et al., 2000]. Грудное молоко (2000 мл) делипидировали центрифугированием при температуре 4°C, в течение часа при 500 g и затем 30 минут при 10000 g. Надосадочную жидкость фильтровали на воронке Бюхнера под давлением вакуумного насоса через 6 слоев марли и 2 слоя фильтровальной бумаги. Полученный 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. Не связавшиеся со смолой белки отмывали 500 мл PBS, а Lf, задержавшийся на колонке, элюировали линейным градиентом концентрации NaCl: по 300 мл 0,15 M – 1 M NaCl, содержащих 10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4. На втором этапе Lf подвергали гель-фильтрации на колонке с Сефакрилом S-200 HR.

2.2.3 Получение модифицированных сорбентов

2.2.3.1 Получение BrCN -активированной агарозы

Посредством BrCN-активации можно иммобилизовать на агарозе молекулы, содержащие NH₂-группу [Cuatrecasas, et al., 1968]. Этот метод применялся для получения аффинных сорбентов, необходимых для выделения белков.

Агарозу (Bio-Gel A-1.5m, Coarse, 151-0430, BioRad) в объеме 50 мл промывали холодным (-18°C) 60% ацетоном в объеме 200 мл, переносили в пробирку, заливали 200 мл холодного (-18°C) 60% ацетона и ставили на инкубацию при -18°C в течение 2 часов, добавляли катализатор – 2,5 мл триэтиламина, перемешивали, добавляли 2,5 мл 3M BrCN инкубировали 5 минут, перемешивая каждую минуту и убирая при этом в морозильник. BrCN-активированную агарозу промывали 200 мл холодного (-18°C) 60% ацетона, затем промыли 500 мл 1 mM раствора соляной кислоты, до использования BrCN-активированную агарозу хранили при 2-8°C в 1 mM растворе соляной кислоты не более 30 минут.

2.2.3.2 Связывание белков с BrCN-активированной агарозной матрицей

Для создания аффинной колонки было взято 700 мкг выделенных белков крысы (Ср, Tf или ферритина) и 10 мл BrCN-активированной агарозы. Для связывания белков с BrCN-активированной агарозой были приготовлены следующие растворы:

- 1) Раствор А: 1 мМ HCl,
- 2) Раствор В: 0,2 М борат-борная кислота, рН 8,0, 1 М NaCl,
- 3) Раствор С: 0,2 М глицин,
- 4) Раствор D: 0,1 М натрий-ацетат, рН 5,5, 1 М NaCl,
- 5) Раствор E: 1 М NaCl.

Протокол проведения связывания белков с BrCN-активированной агарозой:

1) 10 мл активированной агарозы, последовательно промывали 100 мл охлажденного раствора А, 500 мл дистиллированной воды, 100 мл раствора В.

2) Белок растворяли в 2 мл раствора В и добавляли к BrCN-активированной агарозе, инкубацию проводили в течение 3 часов при комнатной температуре на шейкере (50 об/мин). Агарозу последовательно промывали 500 мл раствора В (для удаления несвязавшихся белков), затем промывали 500 мл раствора С (для блокирования непрореагировавших BrCN-активированных участков агарозы), выдерживали в течение ночи при 2-8°C в буфере С, промывали поочередно 4 раза 100 мл раствора В и раствора D. Заполняли колонку (1,5×5 см) агарозой со связанными белками крысы (Ср, Tf либо ферритином), уравнивали раствором E и хранили при 2-8°C до использования.

2.2.4 Получение очищенных препаратов антител

2.2.4.1 Иммунизация кроликов белковыми антигенами

Метод получения поливалентной антисыворотки (АС) иммунизаций препаратами Ср, Tf и ферритина крысы, заключенными в ПААГ, успешно применяется в нашей лаборатории [Захарова, и соавт., 1983].

Для проведения иммунизации был приготовлен буфер PBS: 0,02 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 150 мМ натрия хлорид.

Для этого образец белка подвергали ЭФ в ПААГ в неденатурирующих условиях. Окрашивая боковые края (1 см с каждой стороны), для иммунизации брали центральную узкую полоску геля, которая соответствовала окрашенному белку крысы. Кусочки геля с белком (при расчете 100 мкг на животное) измельчали в гомогенизаторе с PBS и полным (неполным для 2 и 3 иммунизации) адьювантом Фрейнда (1/10 от объема смеси).

Суспензии вводили кроликам внутрикожно в парапозвоночную область интервалами в две недели, и через 10-12 суток после третьей иммунизации из ушной вены у животных забирали кровь (по 50 мл). После свертывания крови полученную сыворотку замораживали и использовали как АС для иммуноэлектрофореза.

2.2.4.2 Выделение фракции иммуноглобулина G из антисыворотки кролика

Для освобождения от примесных белков антисыворотки выделяли иммуноглобулин G (IgG) кролика [Herd, et al., 1970]. IgG из антисыворотки высаливали с помощью насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 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 17,5 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 6.3). Полученный раствор пропускали через колонку с DEAE-Sephadex A-50, антитела выходили с колонки вместе со свободным объемом буфера, вторую фракцию IgG элюировали 0,035 М NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 7.6). Эти фракции, представленные единственной 160 кДа-зоной (60 и 20 кДа-зонами при разрыве S-S связей) по данным ЭФ в ПААГ с SDS, были объединены. IgG диализовали против дистиллированной воды до исчезновения осадка при пробе с Ba^{2+} на фосфаты и затем лиофилизировали.

2.2.4.3 Получение специфических антител кролика к белкам крысы

Для выделения специфических антител использовали методы аффинной хроматографии [Hinman, et al., 1985].

Для выделения специфических антител кролика к белкам (Ср, Tf либо ферритину) крысы фракции IgG из антисыворотки кролика были приготовлены следующие растворы:

- 1) Буфер А: 0,01 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, 0,15 М NaCl,
- 2) Буфер В: 0,01 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, 0,3 М NaCl,
- 3) Буфер С: 0,1 М глицин-HCl, pH 3,0, 0,1 М NaCl.

Аффинную колонку (1,5×5 см) ВrCN-активированной агарозы со связанными белками крысы (Ср, Tf либо ферритином) промывали буфером А в объеме 50 мл. Лиофилизированную фракцию IgG из антисыворотки кролика растворяли в 10 мл буфера А, наносили на колонку, колонку промывали 50 мл буфера А, промывали 50 мл буфера В. Элюцию специфических иммуноглобулинов кролика к белкам (Ср, Tf либо ферритину) крысы проводили буфером С в общем объеме 50 мл, собирая фракции по 10 мл в пробирки содержащие 2 мл 3М трис-HCl, pH 7,8. Выделенные фракции были объединены и сконцентрированы в ультрафильтрационных центрифужных концентраторах Vivaspin

500 с диаметром пор 30 кДа (Сарториус, Россия) путем центрифугирования при 7000 g при 2-8°C в течение 10 минут, дважды промыты буфером А. Перекрестная специфичность выделенных антител к белкам (Ср, Tf либо ферритину) крысы была проверена методами иммуоферментного анализа (см. п. 2.6.4-2.6.6).

2.3 Моделирование

2.3.1 Стрептозотоциновая модель гипергликемии у крыс

Использована модель стрептозотоксин-индуцированной гипергликемии [Akbarzadeh, et al., 2007]. Принцип метода: стрептозотоксин (STZ) является токсическим соединением из группы производных нитрозомочевины, избирательно проникающим в панкреатические β -клетки посредством переносчика GLUT-2. Панкреатотоксичность STZ в значительной мере связывают с алкилирующей активностью его метильной группы, приводящей к фрагментации ДНК β -клеток, в ответ на которую активируется участвующий в репарации поврежденной ДНК фермент поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP). Развивающийся, в связи с этим дефицит запасов кофактора NAD^+ , а затем и энергетических субстратов в виде АТФ, неминуемо приводит, в конечном счете, к некрозу β -клеток [Szkudelski, 2001].

Эксперимент проводили на крысах — самцах линии Wistar в возрасте 5 недель (инъекции раствора стрептозотоксина моногидрата из расчета 43 мг/кг массы). Развитие диабета подтверждалось уровнем глюкозы (>10 мМ) в периферической крови, взятой у крыс натощак.

Было использовано три схемы введения лактоферрина (Lf): 1) терапевтическая — доза 50 мг/кг ежедневно с 1 по 5 день от введения STZ (8 крыс в опытной и 8 в контрольной группе); 2) профилактическая — доза 250 мг/кг за 5 дней до введения STZ (8 в опытной крыс и 8 в 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 (7 крыс в опытной и 7 в контрольной группе).

В день инъекции STZ и через 35 дней у крыс отбирали кровь, разделяя на 2 аликвоты. Одну аликвоту использовали для оценки ферроксидазной активности Ср (сыворотка крови без антикоагулянтов после свертывания). Другую стабилизировали K_3 -ЭДТА, и использовали полученную плазму второй аликвоты для определения концентрации глюкозы и SH-групп, а эритроцитарную массу для определения активностей глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы в гемолизате.

2.3.2 Гликирование церулоплазмينا и трансферрина *in vitro*

Гликирование Ср проводили путем инкубации раствора белка с различными концентрациями глюкозы.

Для проведения гликирования были приготовлены следующие растворы:

- 1) Буфер для гликирования: 40 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,4, 0,01% гентамицин (в качестве бактериостатика),
- 2) Растворы Ср с глюкозой: растворы, содержащие 3 мкМ (0,4 мг/мл) Ср и 0, 5, 15 или 30 мМ глюкозы, приготовленные на буфере для гликирования.

Схема проведения анализа: инкубацию растворов Ср с глюкозой проводили в течение недели при 4°C и 37°C. После инкубации определяли *p*-фенилендиаминоксидазную и удельную ферроксидазную активности Ср, концентрацию фруктозамина, а также проводили ЭФ в ПААГ полученных проб с последующим выявлением оксидазной активности Ср методом окрашивания раствором *o*-дианизидина (см. пп. 2.1.1.1, 2.1.1.2, 2.1.1.9, 2.1.2.3). Подготовка образцов для проведения электрофоретического разделения Ср, подвергнутого инкубации с различными концентрациями глюкозы в течение недели: к 5 мкл буфера для проб добавляли 2 мкл образца Ср, перемешивали и вносили в лунку ПААГ-геля.

Гликирование Tf проводили путем инкубации раствора белка с различными концентрациями глюкозы. Растворы 51,3 мкМ (4 мг/мл) Tf с 0, 5, 15 или 30 мМ глюкозой, приготовленные на буфере для гликирования инкубировали в течение 2 недель при 4°C и 37°C. После инкубации определяли железо-связывающую способность Tf (см. п. 2.1.1.4).

2.4. Статистические методы

Статистическая обработка данных осуществлялась при помощи пакета программ Statistica (версия 10.0). Эксперименты повторяли три раза ($n=3$, если не указано иначе). 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 *post hoc* 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.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ изменений метаболизма железа в зависимости от степени компенсации сахарного диабета 2 типа

Существующие данные об изменении концентрации железа и меди у пациентов с СД2 противоречивы, например, показано увеличение [El-Zebda, 2006], снижение [Basaki, et al., 2012] и отсутствие изменений [Terres-Martos, et al., 1998] в концентрации меди у пациентов по сравнению с контрольной группой доноров. Концентрация Fe в сыворотке крови была значительно выше при СД2 по сравнению с контрольной группой [Atari-Hajipirloo, et al., 2016], накопление железа в организме прогнозирует развитие СД2 [Salonen, et al., 1998]. Доля HbA1c положительно коррелировала с концентрацией свободного железа и меди у пациентов с СД2 [Atari-Hajipirloo, et al., 2016].

С помощью аналитических методов, описанных в разделе 2.1, нами 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. Доля HbA1c, взятая за основу для деления здоровых доноров (группа 1), пациентов с компенсированным СД2 (группа 2) и пациентов с некомпенсированным СД2 (группа 3), отличается при сравнении всех групп. Концентрация Ср, измеренная по реакции с антителами, хотя и незначительно, но увеличена в группе 3 по сравнению с группой 1 и 2. При этом оксидазная активность Ср в отношении пара-фенилендиамина (p-PD), ферроксидазная активность Ср и концентрация Cu, напротив, снижена как в группе с компенсированным СД2, так и в группе с некомпенсированным СД2 по сравнению с контролем. Итогом таких изменений явилось снижение удельной ферроксидазной активности Ср (FerOx/Cr), удельной активности в отношении p-PD ($\text{p-PD}/\text{Cr}$) и насыщения Ср ионами меди (Cu/Cr) по мере увеличения доли HbA1c. В случае группы 1 (здоровые доноры) обнаруживается близкое к ожидаемому отношение 6 моль меди на 1 моль Ср, а именно такое отношение обнаруживается при анализе количества меди в очищенных препаратах Ср [Соколов и соавт., 2012].

Полученные данные свидетельствуют о том, что по мере усиления гипергликемии количество ионов меди, приходящихся на 1 молекулу Ср, снижается. В целом, такие изменения хорошо согласуются с результатами модификации Ср метаболитами,

характерными для СД2, *in vitro*: инкубация Ср с метилглиоксалем либо аминокетоном приводила к потере белком ионов меди и снижению его ферментативной активности [Dutra, et al., 2005].

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 Ср (FerOx), Е/л	817±23	712±13	697±14	0,000	0,000	NS
p-PD-оксидазная активность Ср (p-PD), мкМ	3,5±1,1	3,2±0,9	3,1±0,5	0,003	0,004	NS
FerOx/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 (ТВС), 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
ТВС/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
FerOx/Cp, Е/мкмоль	241,5±5,2	208,3±2,1	178,6±2,8	0,000	0,000	0,000
Fe/ТВС, моль/моль	0,38±0,15	0,41±0,13	0,40±0,12	NS	NS	NS
2Fe/Tf, %	31±1	25±1	19±2	0,000	0,000	0,003

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

Мы предположили, что изменение ферроксидазной активности Ср могло бы быть скомпенсировано увеличением LDL, поскольку последние также проявляют ферроксидазную активность [Topham, et al., 1970]. Однако не было выявлено значительных изменений концентрации холестерина LDL, при этом обнаружено лишь снижение холестерина HDL у пациентов с некомпенсированным СД2.

При сравнении концентрации железа в сыворотке, общей железосвязывающей способности (ТІВС) и насыщения железом трансферрина ($[Fe]/TIBC$) не было выявлено различий между группами. Однако при сравнении групп концентрация Tf была выше у пациентов с компенсированным СД2 по сравнению со здоровыми донорами, а также у пациентов с некомпенсированным СД2 по сравнению со здоровыми донорами и с пациентами с компенсированным СД2. Отсутствие изменений в ТІВС, которая главным образом отражает железо-связывающую способность Tf, при увеличении концентрации Tf по мере усиления гипергликемии свидетельствует о нарушении железо-связывающей способности Tf, что, вероятно, обусловлено изменением структуры последнего или снижением функциональной активности Ср, который поддерживает встраивание Fe^{3+} в Tf. Так, одна молекула Tf способна связывать 2 иона железа, и если у здоровых доноров (группа 1) 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.

В то время как насыщение железом трансферрина, выраженное отношением $[Fe]/TIBC$, не отличалось в группах, напротив, отношение ТІВС к Tf и отношение концентрации Fe к Tf, характеризующие удельную способность Tf связывать Fe(III), снижались у пациентов с компенсированным СД2 по сравнению со здоровыми донорами, а также у пациентов с некомпенсированным СД2 по сравнению со здоровыми донорами и с пациентами с компенсированным СД2. Таким образом, именно насыщение Tf, оцениваемое по отношению концентрации железа к концентрации Tf, а не насыщение Tf, оцениваемое по отношению концентрации железа к ТІВС, позволило выявить изменение железо-связывающей функции Tf при развитии диабета.

Использование такого показателя, как насыщение трансферрина, рассчитанное общепринятым отношением $[Fe]/TIBC$, при оценке прогнозов течения заболевания и рисков летального исхода [Taske, et al., 2016] у пациентов с СД2 при коронавирусной инфекции может давать искаженные результаты. Кроме того, поскольку антитела к вирусу SARS-CoV-2 могут связывать Tf [Sokolov, et al., 2022], то высокая концентрация Tf при СД2 может нивелировать гуморальный иммунный ответ и снижать противовирусную защиту организма.

Снижение концентрации железа при СД2, которое, как мы считаем, компенсируется повышением концентрации Tf, может быть скорректировано введением препаратов Lf. Lf опосредует свое действие через систему ЭПО и оказывает множественные эффекты – увеличение синтеза Ср, который особенно сильно подвергается окислительным модификациям при гипергликемии у крыс и СД2, более выраженное, чем у Tf, связывание железа и непосредственную доставку Fe в клетки. Последнее особенно важно при СД2 у пациентов с SARS-CoV-2, поскольку восполнение дефицита железа, ведет к снижению концентраций TfR и Tf, а, следовательно, блокирует один из альтернативных путей проникновения вируса в клетку через TfR и снижает частоту связывания антител против вируса SARS-CoV-2 с сывороточным Tf.

3.2 Особенности метаболизма железа в зависимости от степени компенсации сахарного диабета 2 типа

В таблице 2 суммированы результаты исследования корреляционных связей между параметрами в группах 1, 2 и 3 (приведены только значения статистически значимых коэффициентов корреляций), для облегчения визуального восприятия обнаруженных корреляционных связей для каждого параметра построено по три круговых схемы (по числу групп), где красными и синими соединительными линиями отображены положительные и отрицательные коэффициенты, а толщина линий пропорциональна значениям коэффициентов корреляции (см. Рисунок 4.1-4.17 в Приложении). Прежде всего, следует выделить корреляционные связи, которые выявлены во всех трех группах.

Положительные связи между концентрацией меди, концентрацией Ср, его ферроксидазной активностью и активностью в отношении р-PD выше 0,8 в группе 1 и слегка снижаются в группах 2 и 3. Например, сильная положительная корреляция FerOx и концентрации Ср в группе условно здоровых пациентов ($r=0,84$) и пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,85$) в группе с некомпенсированным СД2 выражена слабее ($r=0,66$), $p_{13}=0,03$, $p_{23}=0,009$. Сильная положительная корреляция активности Ср в отношении р-PD и концентрации Ср (Рисунок 3.1) в группе условно здоровых пациентов ($r=0,98$) и пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,96$) в группе с некомпенсированным СД2 выражена слабее ($r=0,88$), $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,0006$.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между параметрами, измеренными в группах 1-3

№ группы (1)	HbA1c (2)	Cp (3)	Fe (4)	FerOx (5)	p-PD (6)	FerOx /p-PD (7)	HDL (8)	LDL (9)	Cu (10)	TIBC (11)	Tf (12)	p-PD/ Cp (13)	TIBC/ Tf (14)	Cu/Cp (15)	FerOx/ Cp (16)	Fe/ TIBC (17)
Cp	1	0,336	1													
	2	-0,251	1													
	3	-	1													
Fe	1	-	-	1												
	2	-	-	1												
	3	-	-	1												
FerOx	1	0,242	0,839	-	1											
	2	-0,224	0,853	-	1											
	3	-	0,655	-	1											
p-PD	1	0,309	0,984	-	0,861	1										
	2	-0,259	0,985	-	0,863	1										
	3	-	0,877	-	0,808	1										
FerOx/ p-PD	1	-	-0,264	-	0,268	-0,251	1									
	2	-	-0,339	-0,145	-	-0,347	1									
	3	-	-0,392	-0,459	-	-0,350	1									
HDL	1	-	0,280	-	0,309	0,293	-	1								
	2	-0,188	0,161	-	-	0,149	-	1								
	3	-	-	-	-	-	-	1								
LDL	1	-	-	-	-	-	-	-0,211	1							
	2	-	0,156	0,206	-	0,173	-	-	1							
	3	-	0,373	-	0,365	0,390	-	-	1							
Cu	1	0,287	0,930	-	0,836	0,952	-0,207	0,326	-	1						
	2	-0,250	0,893	-	0,807	0,872	-0,199	0,214	-	1						
	3	-	0,621	-	0,641	0,729	-	-	0,322	1						

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
TIBC	1	0,229	0,400	-	0,405	0,425	-	-	-	0,455	1					
	2	-	0,292	-	0,261	0,299	-	0,155	-	0,273	1					
	3	-	-	0,388	-	-	-	-	-	-	1					
Tf	1	0,453	0,241	-0,548	0,192	0,232	-	-	-	0,243	0,720	1				
	2	0,324	0,162	-0,158	-	0,155	-	-	-	0,157	0,774	1				
	3	-	-	0,353	-	-	-	-	-	-	0,825	1				
p-PD/ Cp	1	-0,230	-0,415	-	-	-0,261	-	-	-	-0,211	-	-	1			
	2	-	-	-	0,200	0,222	-	-	-	-	-	-	1			
	3	-0,380	-	-	0,321	0,273	-	-	-	-	-	-	1			
TIBC/ Tf	1	-0,411	-	0,756	-	-	-	-	-	-	-	-0,785	-	1		
	2	-0,534	-	0,212	-	-	-	-	-	-	-	-0,567	0,149	1		
	3	-0,349	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,658	-	1		
Cu/Cp	1	-	-0,237	-	-	-	0,193	-	-	-	-	-	0,606	-	1	
	2	-	-	-0,205	-	-	0,264	0,149	-	0,385	-	-	-	-	1	
	3	-0,321	-0,311	-	-	-	0,271	0,311	-	0,545	-	-	0,539	-	1	
FerOx/ Cp	1	-0,203	-0,348	-	0,201	-0,294	0,959	-	-	-0,241	-	-	0,450	-	0,348	1
	2	-	-0,309	-	0,189	-0,259	0,935	-	-	-0,191	-	-	0,308	-	0,223	1
	3	-	-0,427	-0,409	0,394	-	0,810	-	-	-	-	-	0,634	-	0,526	1
Fe/ TIBC	1	-0,242	-	0,935	-	-	-	-	-	-0,428	-0,716	-	0,739	-	-	-
	2	-	-	0,883	-	-	-	-0,181	0,154	-0,175	-0,465	-0,463	-	-	-0,206	-
	3	-	-	0,922	-	-	-0,465	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,447
Fe/ Tf	1	-0,280	-	0,920	-	-	-	-	-	-0,370	-0,740	-	0,840	-	-	0,970
	2	-	-	0,865	-	-	-	-	-	-0,377	-0,591	-	0,461	-0,167	-	0,935
	3	-	-	0,853	-	-	-0,388	-	-	-	-	-	-	-	-0,363	0,955

Примечание: обозначения параметров соответствуют таблице 1.

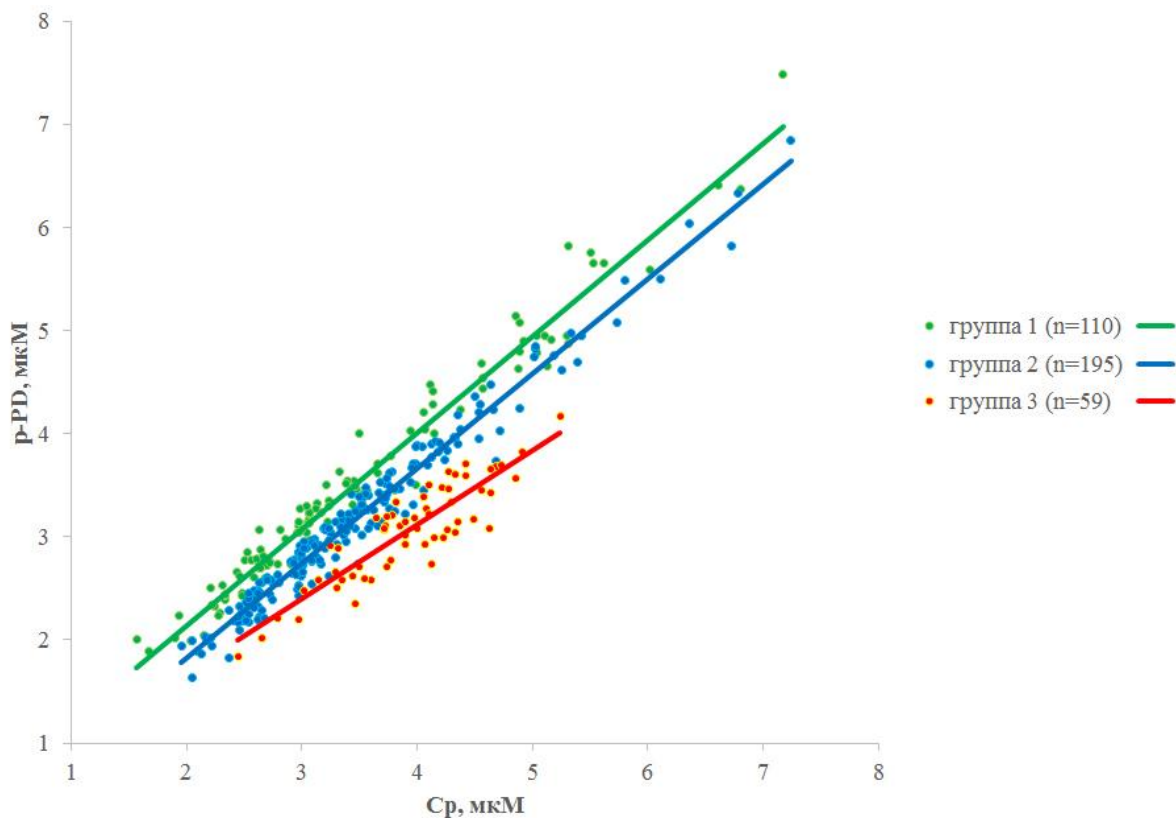


Рисунок 3.1. Диаграмма рассеяния активности Ср в отношении p-PD на концентрации Ср

Учитывая, что оксидазная активность Ср зависит как от модификации аминокислотных остатков, участвующих в связывании субстрата, так и от связывания с ферментом ионов Cu , осуществляющих перенос электронов от окисляемого субстрата на молекулярный кислород с последующим образованием воды, логично было предположить, что и зависимости между концентрацией ионов меди и концентрацией Ср будут отличаться в образцах сыворотки крови, полученных от здоровых доноров и пациентов с различной степенью компенсации СД2. Тем более что по данным таблицы 1 нами были обнаружены отличия в отношении количества ионов меди, приходящихся на 1 моль Ср.

Действительно, сильная положительная корреляция концентрации меди и концентрации Ср в сыворотке крови (Рисунок 3.2) в группе условно здоровых пациентов ($r=0,93$) и пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,89$) в группе с некомпенсированным СД2 выражена слабее ($r=0,62$), $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,000$.

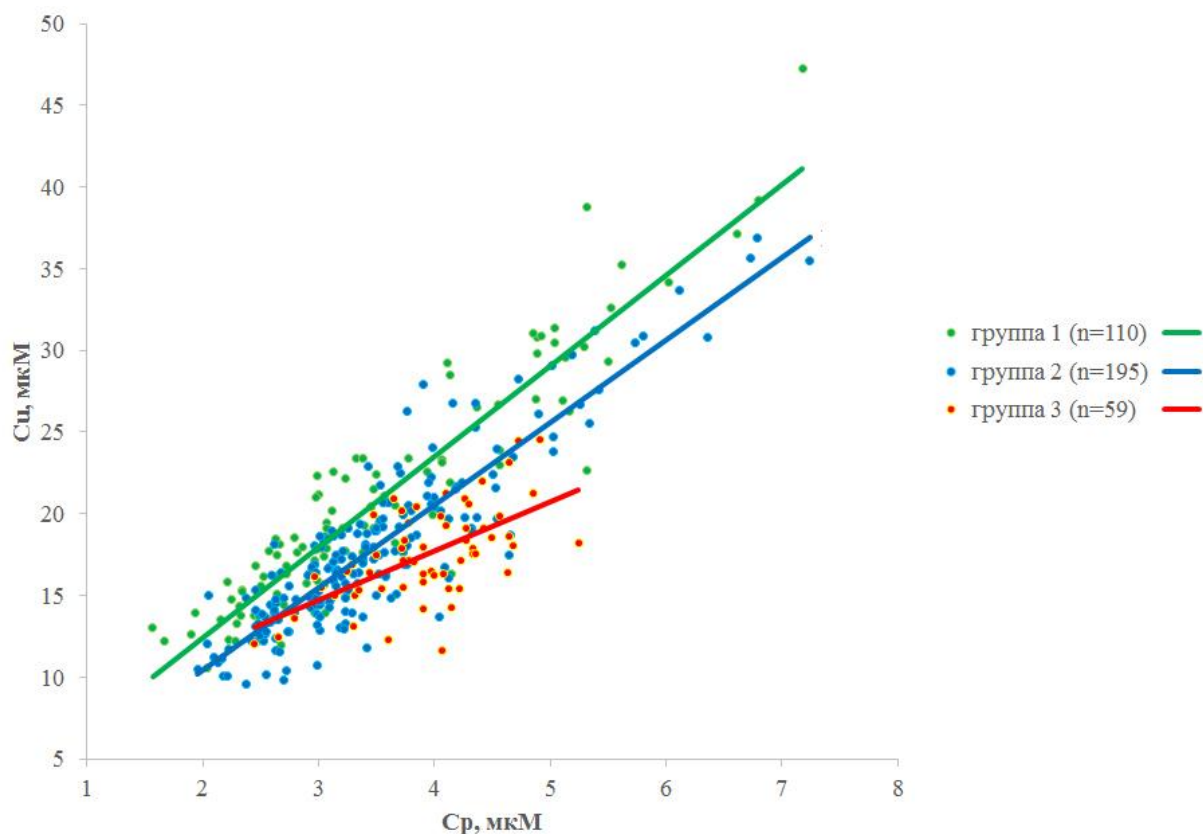


Рисунок 3.2. Диаграмма рассеяния концентрации меди на концентрации Ср

Сильная положительная корреляция активности Ср в отношении р-PD и концентрации меди в сыворотке крови в группе условно здоровых пациентов ($r=0,95$) и пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,87$) в группе с некомпенсированным СД2 выражена слабее ($r=0,73$), $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,024$, $p_{12}=0,000$ (см. таблицу 2). Несмотря на то, что количественная оценка скорости реакции окисления р-PD, катализируемой Ср, является классическим лабораторным методом определения оксидазной активности Ср и позволяет достаточно надежно провести расчет концентрации Ср в образцах сыворотки крови, именно ферроксидазная активность является физиологической реакцией, катализируемой данным ферментом и определяет его участие в обмене железа. Поэтому не менее важно было оценить изменение корреляционных связей между концентрацией ионов меди и ферроксидазной активностью Ср.

Сильная положительная корреляция FerOx и концентрации меди в сыворотке крови (Рисунок 3.3) в группе условно здоровых пациентов ($r=0,84$) и пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,81$) в группе с некомпенсированным СД2 выражена слабее ($r=0,64$), $p_{13}=0,018$, $p_{23}=0,047$. Качественно снижение коэффициентов корреляции совпадает со снижением удельной ферроксидазной активности Ср, выявленной при дисперсионном анализе (см. таблицу 1).

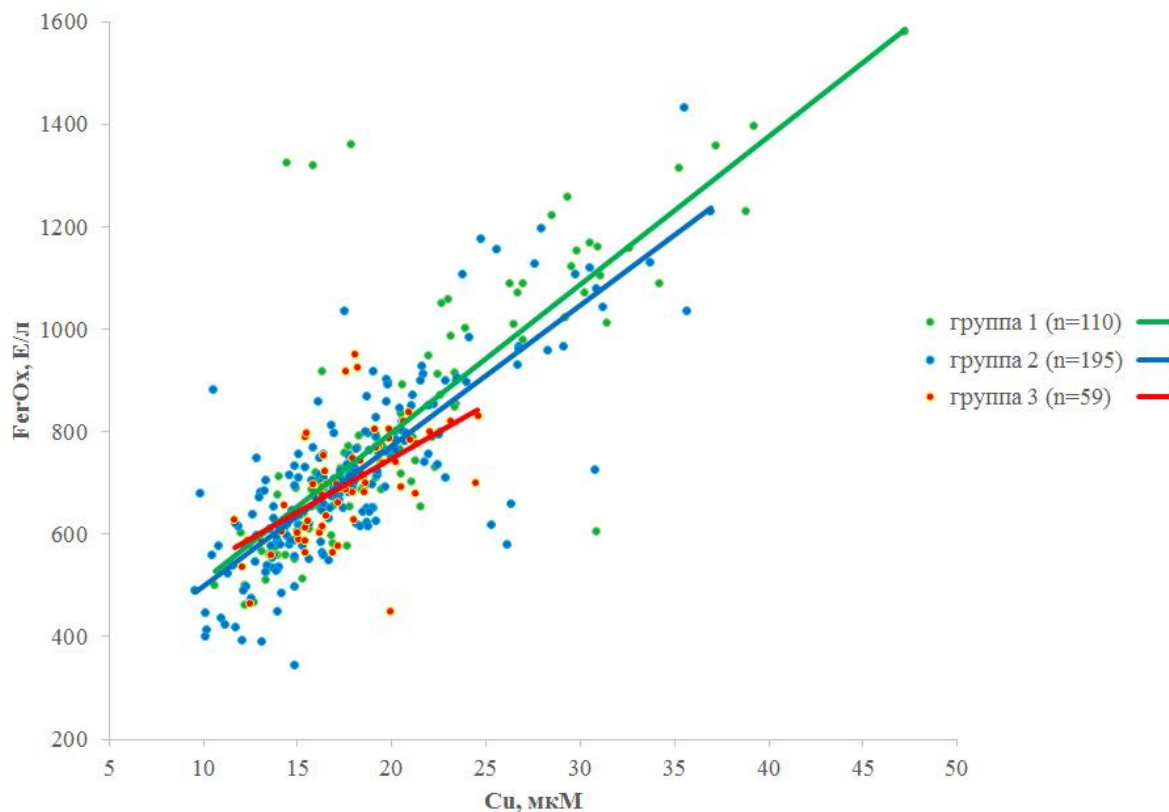


Рисунок 3.3. Диаграмма рассеяния ферроксидазной активности Ср на концентрации Си

Учитывая сильные корреляционные связи между концентрацией Ср, его ферроксидазной активностью и концентрацией меди были получены уравнения одномерной и многомерной регрессии данных показателей в группах, которые суммированы в таблицах 3 и 4, соответственно.

В случае одномерной регрессии концентрации ионов меди в сыворотке крови на концентрации Ср обращает на себя внимание значительное снижение значения коэффициента при показателе Ср по мере усугубления СД2, более того для группы 3 уравнение характеризуется наличием свободного члена (см. таблицу 3). Качественно снижение коэффициента при показателе Ср согласуется со снижением количества ионов меди, приходящихся на 1 моль Ср, по мере усугубления гипергликемии, а увеличение «свободного члена уравнения» позволяет предполагать увеличение количества не связанной с Ср меди.

Аналогичные изменения наблюдаются и в случае многомерной регрессии: уменьшается коэффициент при показателе Ср и увеличивается – при показателе FeOx (см. таблицу 4). Эти изменения можно трактовать как снижение насыщения ионами меди Ср, которое, безусловно, сказывается на его ферментативной активности. Уравнения

многомерной регрессии, описывающие зависимость ферроксидазной активности от концентрации Ср и ионов меди также свидетельствуют о том, что по мере усугубления гипергликемии изменяется как вклад Ср, так и ионов Cu. В целом эти наблюдения согласуются с изменениями удельной ферроксидазной активности Ср и количества ионов меди, приходящихся на 1 моль Ср (см. таблицу 1).

Таблица 3. Уравнения одномерной линейной регрессии концентрации меди (Cu, мкМ) на концентрации Ср (Ср, 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)	$Cu = (5,54 \pm 0,21) \times Ср$	p=0,000
2 (N=195)	$Cu = (5,06 \pm 0,18) \times Ср$	p=0,000
3 (N=59)	$Cu = (3,03 \pm 0,52) \times Ср + (5,62 \pm 2,07)$	p=0,000 и p=0,009
Примечание: уровни значимости при сопоставлении параметров уравнения регрессии p12=0,000, p13=0,000, p23=0,000.		

Таблица 4. Уравнения многомерной линейной регрессии концентрации меди (Cu, мкМ), концентрации Ср (Ср, мкМ) на ферроксидазной активности Ср (FerOx, Е/л) 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)	$Cu = (4,829 \pm 0,357) \times Ср + (0,004 \pm 0,002) \times FerOx$	p=0,000, p=0,015
2 (N=195)	$Cu = (4,254 \pm 0,346) \times Ср + (0,005 \pm 0,002) \times FerOx$	p=0,000, p=0,007
3 (N=59)	$Cu = (2,045 \pm 0,687) \times Ср + (0,008 \pm 0,004) \times FerOx$	p=0,004, p=0,038
1 (N=110)	$FerOx = (102 \pm 31) \times Ср + (13 \pm 5) \times Cu + (197 \pm 42)$	p=0,001, p=0,015, p=0,000
2 (N=195)	$FerOx = (125 \pm 16) \times Ср + (7,5 \pm 2,6) \times Cu + (145 \pm 25)$	p=0,000, p=0,007, p=0,000
3 (N=59)	$FerOx = (95 \pm 22) \times Ср + (9,2 \pm 4,3) \times Cu + (161 \pm 73)$	p=0,000, p=0,038, p=0,031
Примечание: все соответствующие параметры между моделями значимо отличаются (p<0,05).		

Обнаруженные изменения ферроксидазной активности Ср могли бы отразиться на насыщении Tf ионами железа либо общей железосвязывающей способности сыворотки. Такие изменения могут быть обусловлены как снижением способности Ср встраивать ионы Fe в Tf, в следствие гликирования Ср, так и способности Tf связывать Fe после гликирования, что может отразиться на ТГВС. Во всех группах прослеживается сильная

положительная корреляция между концентрацией Tf и ТИВС (Рисунок 3.4), однако, несмотря на увеличение значений коэффициентов корреляции, по мере увеличения гликированного гемоглобина: у условно здоровых пациентов ($r=0,72$), у пациентов 2 группы ($r=0,77$) и пациентов 3 группы ($r=0,82$), их сравнение показано, что отличия коэффициентов между группами значимыми не являются $p_{12}=0,7$, $p_{13}=0,290$, $p_{23}=0,7$.

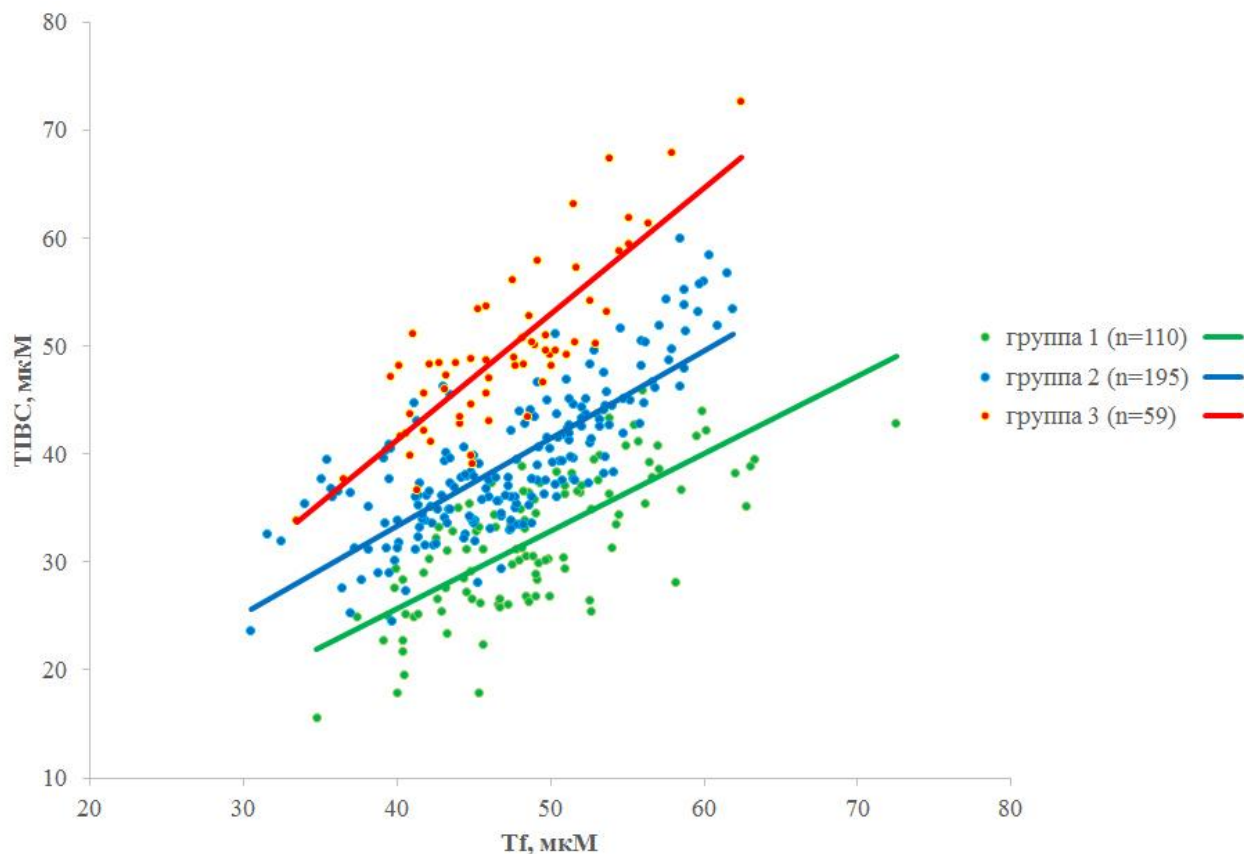


Рисунок 3.4. Диаграмма рассеяния ТИВС на концентрации Tf

Во всех группах прослеживается сильная положительная корреляция между насыщением Tf железом (Fe/Tf) и отношением концентрации Fe и ТИВС (Рисунок 3.5): при этом коэффициенты значимо отличаются между группами 1 и 2, $p_{12}=0,001$. Следует при этом отметить, что сильными связями характеризуются именно отношения концентрации Fe к концентрации Tf и концентрации Fe к ТИВС, а связи между Tf и ТИВС, представленные на Рисунок 3.4 выражены слабее. Поскольку одна молекула Tf связывает 2 иона железа, то наклон линейной регрессии на рисунке 3.5 в норме должен быть близок к 0,5. При этом согласно данным таблицы 1 отношение ТИВС/Tf достоверно снижается от группы 1 к группе 2 и к группе 3. Следовательно, и наклон линейной регрессии должен изменяться от группы 1 к группе 2 и к группе 3.

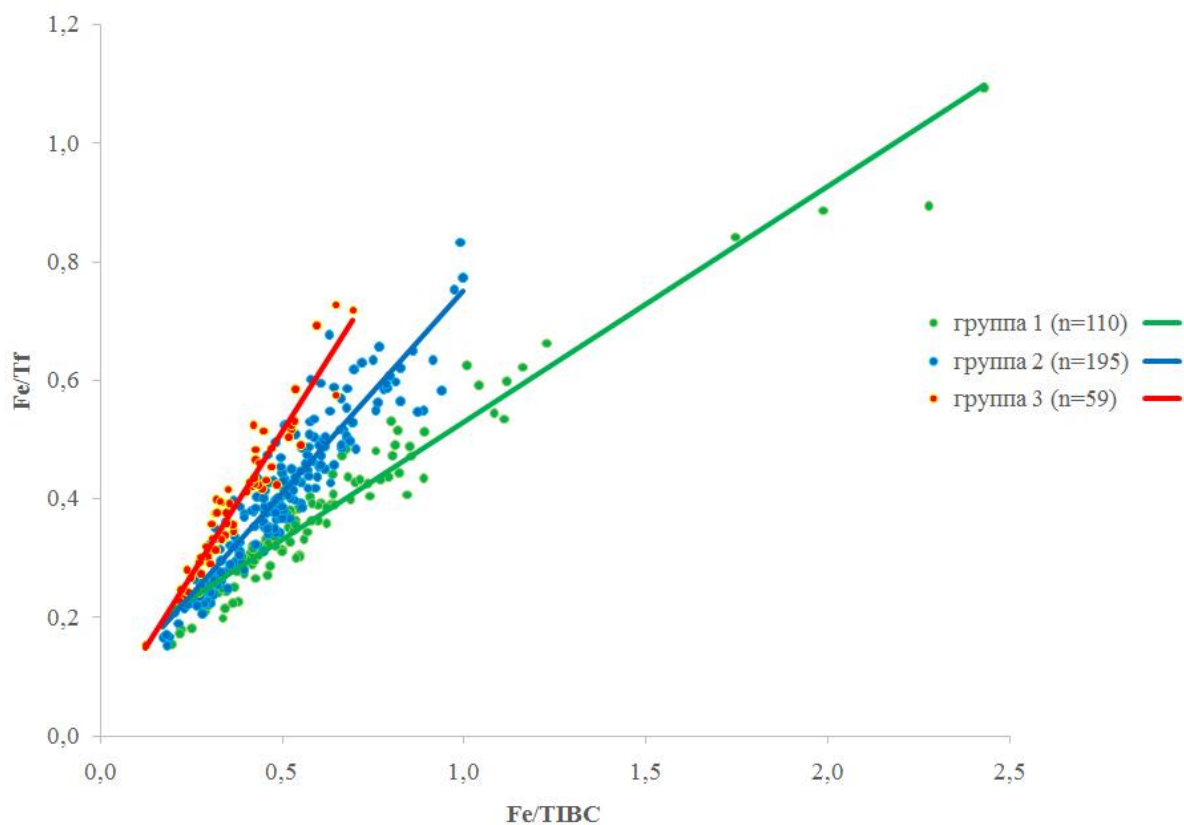


Рисунок 3.5. Диаграмма рассеяния насыщения Tf железом (Fe/Tf) на отношении концентрации Fe к TIBC (Fe/TIBC)

Действительно, уравнения одномерной регрессии, характеризующие корреляционные связи между насыщением Tf железом и отношения концентрации железа к TIBC, полученные для сравниваемых групп, показывают достоверное изменение наклона данных прямых (см. таблицу 5).

Таблица 5. Уравнения одномерной линейной регрессии насыщения Tf железом (Fe/Tf) и отношения концентрации железа к TIBC (Fe/TIBC) 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)	$Fe/TIBC = (0,397 \pm 0,009) \times (Fe/Tf) + (0,134 \pm 0,007)$	$p=0,000$
2 (N=195)	$Fe/TIBC = (0,687 \pm 0,019) \times (Fe/Tf) + (0,065 \pm 0,010)$	$p=0,000$
3 (N=59)	$Fe/TIBC = (0,969 \pm 0,040) \times (Fe/Tf)$	$p=0,000$
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 (ТВС/Тf) – см. Рисунок 3.6: $r=-0,41$ (группа 1), $r=-0,53$ (группа 2) и $r=-0,35$ (группа 3). Сравнение коэффициентов корреляции показало, что отличия между ними не значимыми не являются: $p_{12}=0,21$, $p_{13}=0,67$, $p_{23}=0,15$ (Таблица 2). Несмотря на отсутствие достоверных отличий между коэффициентами корреляции это не отменяет наблюдения о том, что насыщение Тf ионами железа снижается по мере усугубления гипергликемии (доля HbA1c).

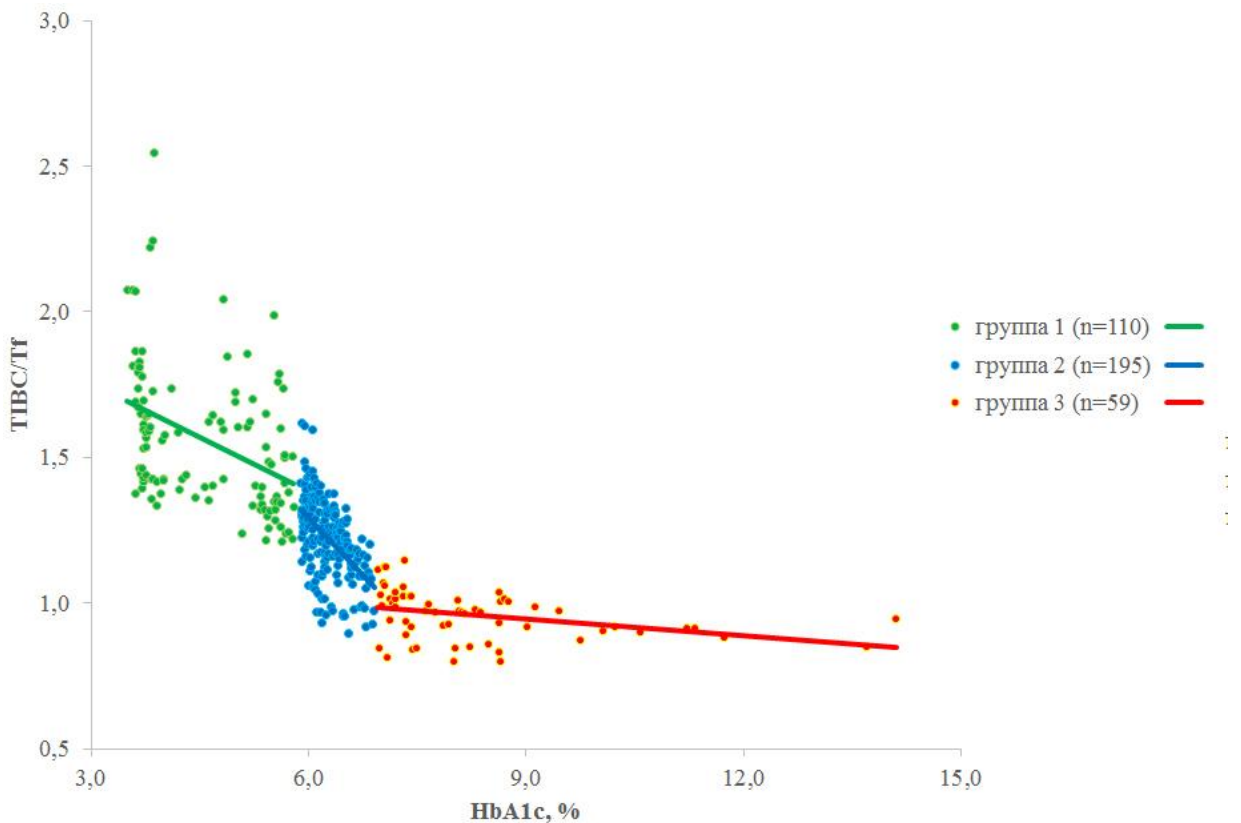


Рисунок 3.6. Диаграмма рассеяния удельной активности Тf (ТВС/Тf) на доле HbA1c

Обращают на себя внимание хотя и слабые, но значимые корреляционные связи, которые были выявлены только у условно здоровых доноров: ферроксидазной активности Ср и концентрации Тf ($r=0,19$) (Таблица 2). Положительная корреляция между ферроксидазной активностью Ср и концентрацией Тf объясняется 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 Тf клетками и увеличиваться его концентрация в плазме крови.

Также среди значимых корреляционных связей – связь концентрации холестерина HDL и LDL ($r=-0,21$) (Таблица 2) и концентрации HDL и ферроксидазной активности Ср ($r=0,31$, Рисунок 3.7) – были выявлены только у условно здоровых доноров. Отрицательная корреляция между концентрацией холестерина HDL и LDL объяснима тем, что оба класса липопротеинов являются переносчиками холестерина, однако, их функция отличается.

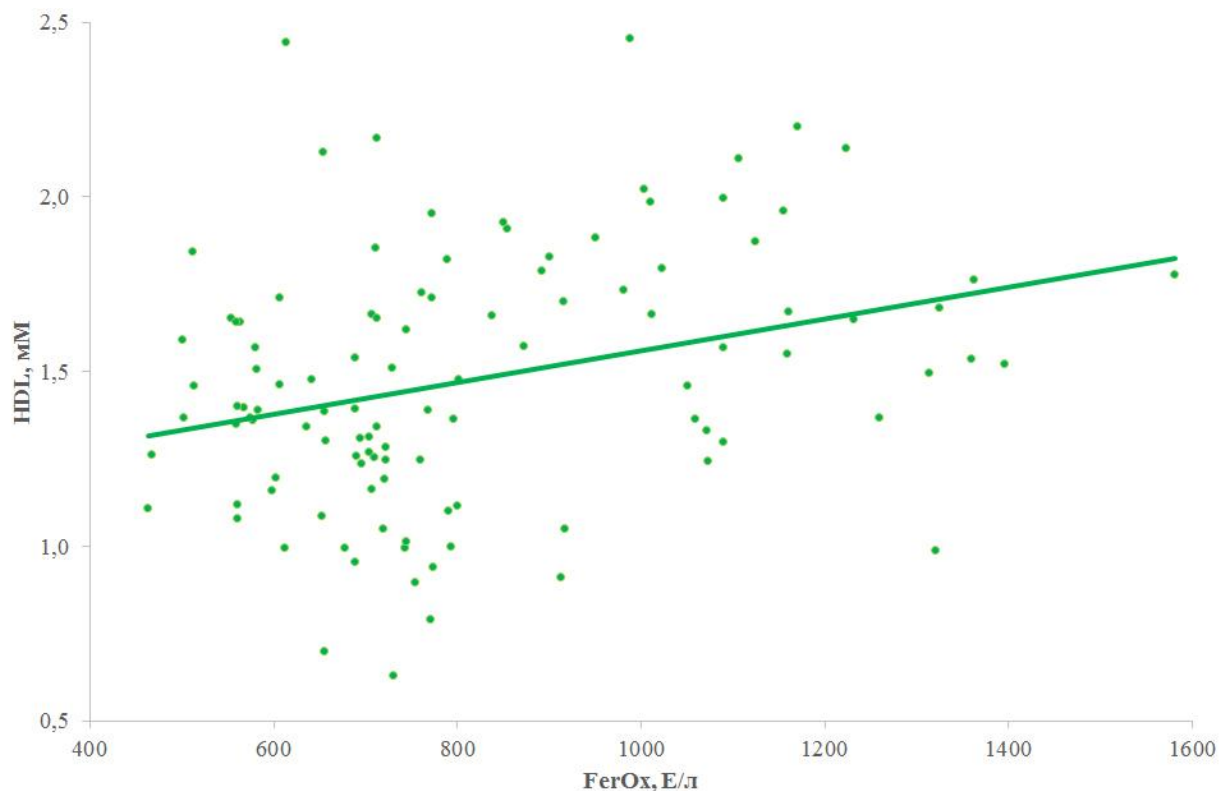


Рисунок 3.7. Диаграмма рассеяния концентрации холестерина HDL на ферроксидазной активности Ср в группе 1

Следует подчеркнуть, что положительная корреляция была обнаружена именно между ферроксидазной активностью Ср и концентрацией холестерина HDL, а корреляционные связи HDL с концентрацией Ср и его активностью в отношении p-PD были менее выраженными. В недавней работе, где были измерены концентрация Ср и холестерина HDL, не было выявлено корреляций данных параметров, хотя для исследования были использованы меньшие по объему группы здоровых доноров ($N=42$) и пациентов с СД2 ($N=88$) [Sharma, et al., 2018]. Отсутствие такой корреляции 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].

Была выявлена корреляционная связь, которая снизила силу, а затем изменила свое направление по мере увеличения доли HbA1c (Рисунок 3.8): так сильная отрицательная связь между концентрацией Fe и Tf у условно здоровых доноров ($r=-0,55$) снизила силу у пациентов с компенсированным СД2 ($r=-0,16$) и изменила направление на положительную корреляцию у пациентов с компенсированным СД2 ($r=0,35$), $p_{12}=0,0006$, $p_{13}=0,000$, $p_{23}=0,000$. 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].

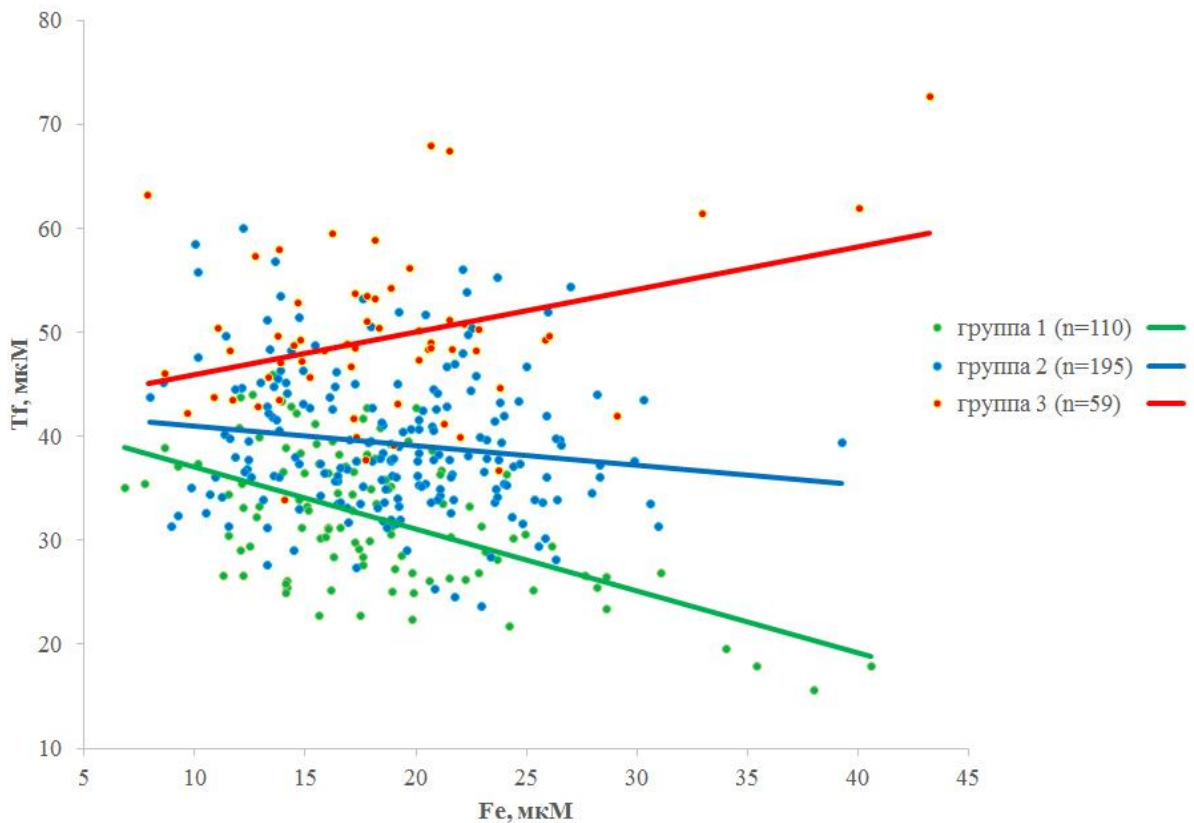


Рисунок 3.8. Диаграмма рассеяния концентрации Tf на концентрации Fe

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. Поскольку апо-Lf

стабилизирует HIF-1 α [Zakharova, et al., 2012], а HIF регулирует экспрессию Tf, таким образом, Tf может оказывать опосредованный протективный эффект на Tf.

Модификация продуктами конечного гликирования Tf приводит к нарушению его способности связывать железо [Ma, et al., 2022; Silva, et al., 2018]. Снижение насыщения Tf железом, ведет к дефициту железа в клетках. Компенсация дефицита железа, которая подтверждается полученными нами результатами отсутствия отличий в концентрации сывороточного железа в группах условно здоровых пациентов и пациентов с компенсированной и некомпенсированной гипергликемией, увеличивает синтез TfR [Fernández-Cao, et al., 2017] и Tf, что также подтверждается полученными нами данными. Такая последовательность событий при СД2 может усиливать изменение направления связей между концентрациями Fe и Tf по мере усиления гипергликемии.

Далее будут рассмотрены корреляционные связи, которые хотя и не отличаются высокими значениями коэффициентов корреляции, но интересны тем, что могут отсутствовать или изменять свое направление в одной из исследованных групп. Например, выявлена положительная корреляционная связь доли HbA1c и активности Ср в отношении p-PD ($r=0,31$), которая изменяется на отрицательную у пациентов группы 2 ($r=-0,26$) и отсутствует у группы 3, $p12=0,012$ (Таблица 2).

Также были выявлены линейные связи, которые значительно ослабевают у пациентов с компенсированным СД2 по сравнению с условно здоровыми донорами и при этом отсутствуют при некомпенсированном СД2: во-первых, ослабевают связи между удельной активностью Tf (ТВС/Tf) и концентрацией Fe ($r=0,76$ у группы 1 и $r=0,21$ у группы 2, см. Рисунок 3.9), $p12=0,000$; во-вторых, ослабевают связи концентрации Tf с Fe/ТВС – насыщением Tf железом ($r=-0,72$ у группы 1 и $r=-0,46$ у группы 2) $p12=0,002$. Данные изменения могут быть обусловлены упомянутым выше влиянием гликирования на опосредованную доступностью железа и HIF-зависимую регуляцию транскрипции гена *Tf*, а также снижением железо-связывающей способности Tf вследствие ковалентной модификации аминокислотных остатков, участвующих в связывании железа продуктами неферментативного окисления глюкозы, повышающимися при гипергликемии сопровождающей СД2.

Однако численные различия коэффициентов корреляции концентрации Tf и долей HbA1c ($r=0,45$ у группы 1 и $r=0,32$ у группы 2) не различаются ($p12=0,206$), как и для корреляции концентрации Tf с концентрацией Cu ($r=0,24$ у группы 1 и $r=0,16$ у группы 2) – $p12=0,5$. Также не различаются коэффициенты для связи: ТВС с концентрацией Ср ($r=0,40$ у группы 1 и $r=0,29$ у группы 2) – $p12=0,3$; ТВС с ферроксидазной активностью Ср ($r=0,41$ у группы 1 и $r=0,26$ у группы 2) – $p12=0,16$; связи между концентрацией

холестерина HDL и Ср ($r=0,28$ у группы 1 и $r=0,16$ у группы 2) – $p_{12}=0,3$; удельной феррооксидазной активностью Ср и концентрацией Cu ($r=-0,24$ у группы 1 и $r=-0,19$ у группы 2) – $p_{12}=0,6$.

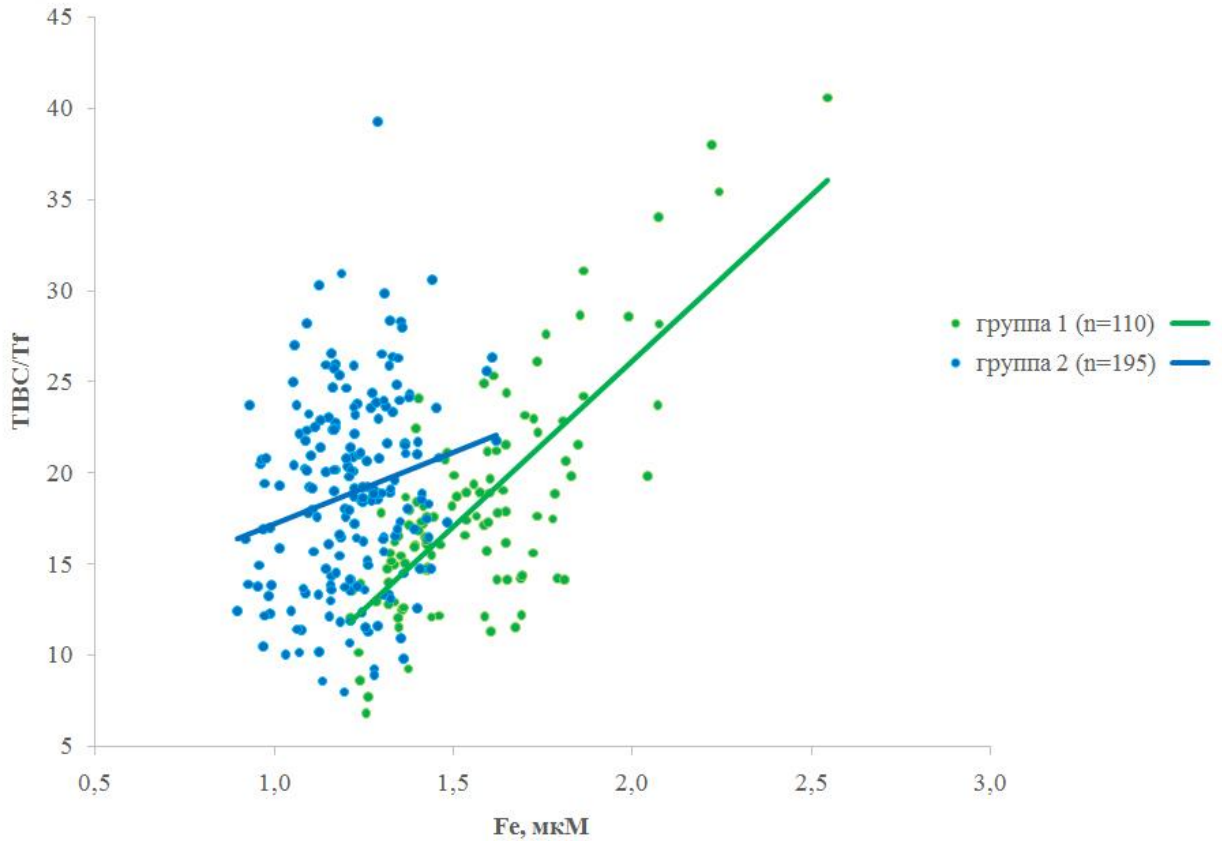


Рисунок 3.9. Диаграмма рассеяния удельной активности Tf (ТВС/Tf) на концентрации Fe в группах 1 и 2

Также были выявлены связи, которые отсутствуют у здоровых доноров. Среди них усиливаются от группы 2 к группе 3: отрицательная корреляция между концентрацией железа и отношением феррооксидазной активности Ср к активности Ср в отношении p-PD (Fe/Ox/p-PD) – $r=-0,15$ и $r=-0,46$ (см. рис 3.10) – $p_{23}=0,024$. Если отношение активностей Ср можно считать мерой специфической модификации Ср, влияющей на снижение его физиологической активности по мере развития гипергликемии при СД2, то вполне логично, что по мере усиления модификации Ср снижается концентрация Fe, которая является результатом участия активности Ср в обмене железа. Хотя положительные корреляции концентрации холестерина HDL и насыщения Ср ионами меди (Cu/Cp) – $r=0,15$ и $r=0,31$ ($p_{23}=0,266$) и концентрации Ср и холестерина LDL – $r=0,16$ и $r=0,37$ ($p_{23}=0,13$) значимо не изменяются от группы 2 к группе 3, эти связи могут подтверждать

тонкие механизмы взаимодействия обмена липидов и меди, которые все чаще обсуждаются в литературе [Yang, et al., 2019].

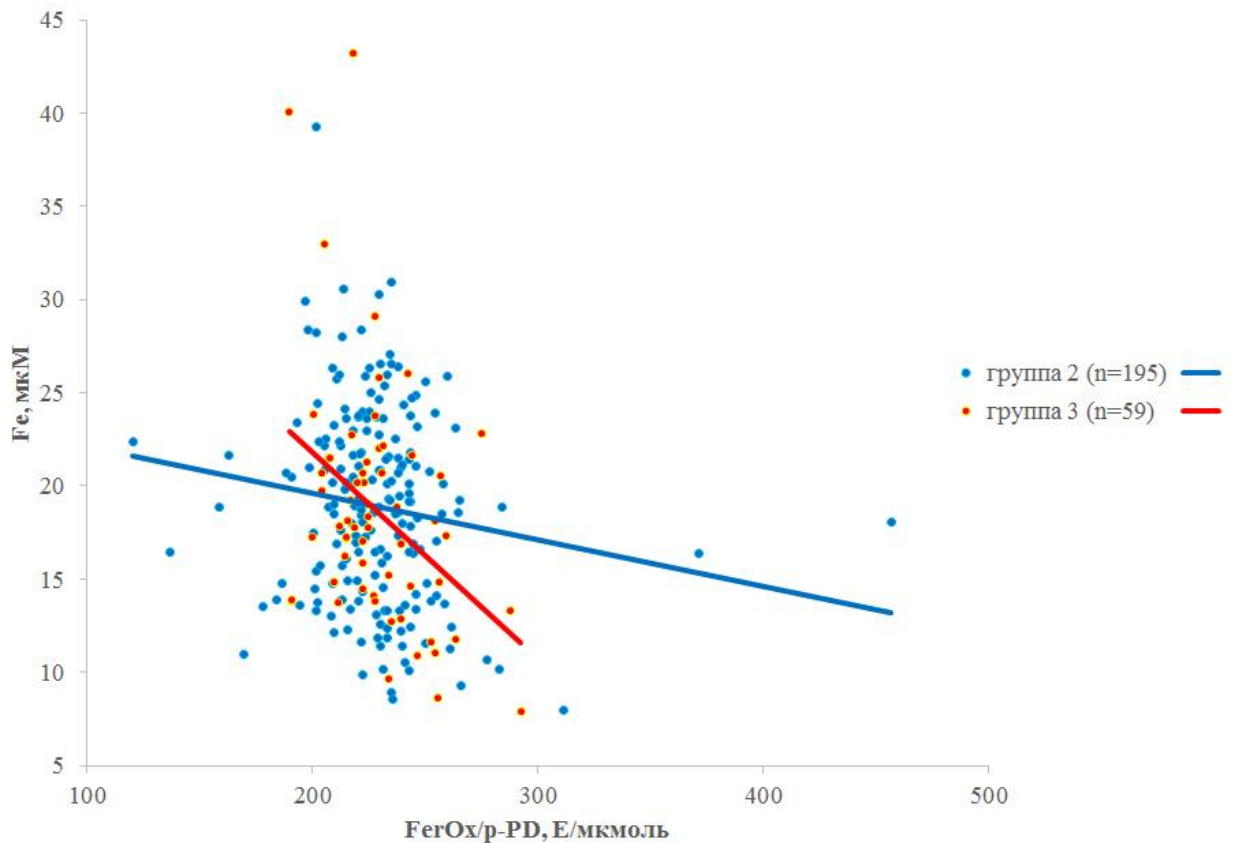


Рисунок 3.10. Диаграмма рассеяния концентрации Fe на отношении ферроксидазной активности Ср к активности Ср в отношении p-PD в группах 2 и 3

Особенного внимания заслуживают связи, которые выявляются только у пациентов с некомпенсированным СД2, но отсутствуют у здоровых доноров и пациентов с компенсированным СД2. Во-первых, это сильные отрицательные связи насыщения Tf железом (Fe/TIBC) с ферроксидазной (FerOx, $r=-0,47$) и с удельной ферроксидазной активностью Ср (FerOx/Ср, $r=-0,45$, Рисунок 3.11), с отношением ферроксидазной активности Ср к активности Ср в отношении p-PD (FerOx/p-PD, $r=-0,47$); во-вторых, отрицательная связь Fe с удельной ферроксидазной активностью Ср (FerOx/Ср, $r=-0,41$) и положительная связь Fe с TIBC ($r=0,39$); в-третьих, положительные связи концентрации холестерина LDL с концентрацией меди ($r=0,32$) и с ферроксидазной активностью Ср ($r=0,37$). Все перечисленные связи согласуются со снижением участия в обмене железа Ср, модифицированного вследствие гипергликемии, а также нарушением отрицательной связи между концентрацией железа и синтезом Tf. Упомянутое выше влияние модификации Ср при гипергликемии на связывание с ним ионов меди подтверждается отрицательной корреляцией между долей HbA1c и насыщением Ср медью (Cu/Ср, $r=-0,32$, Рисунок 3.12).

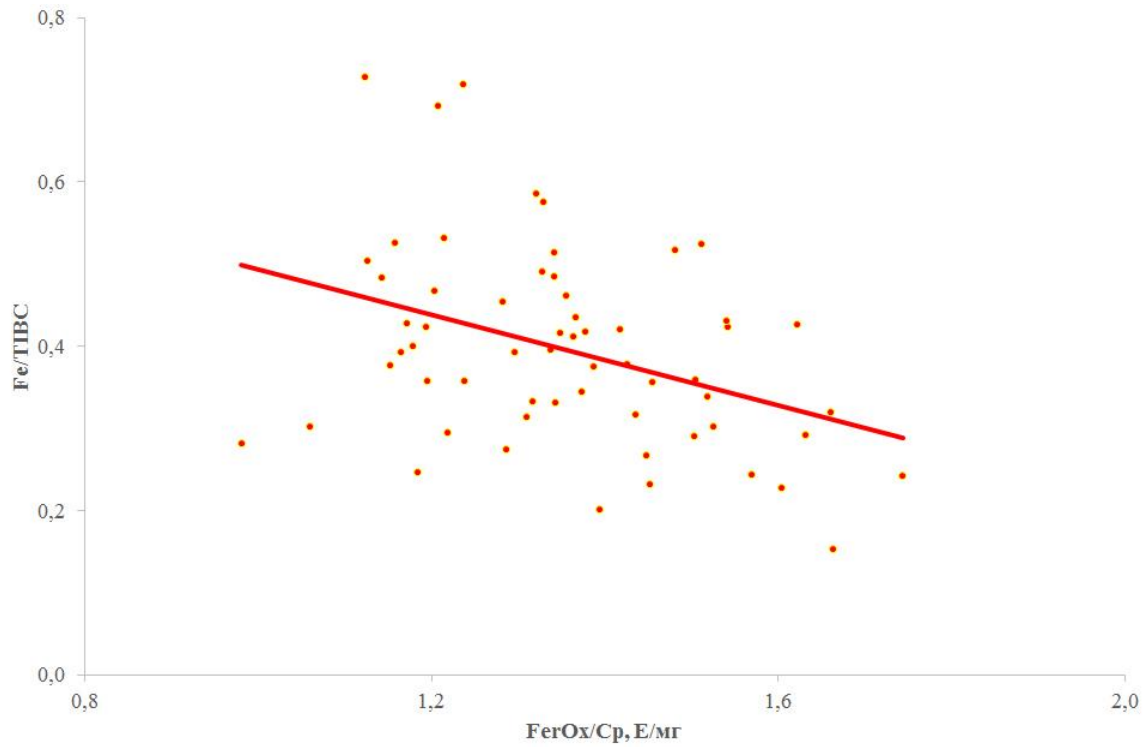


Рисунок 3.11. Диаграмма рассеяния насыщения Tg железом (Fe/TIBC) на удельной ферроксидазной активности Cr в группе 3

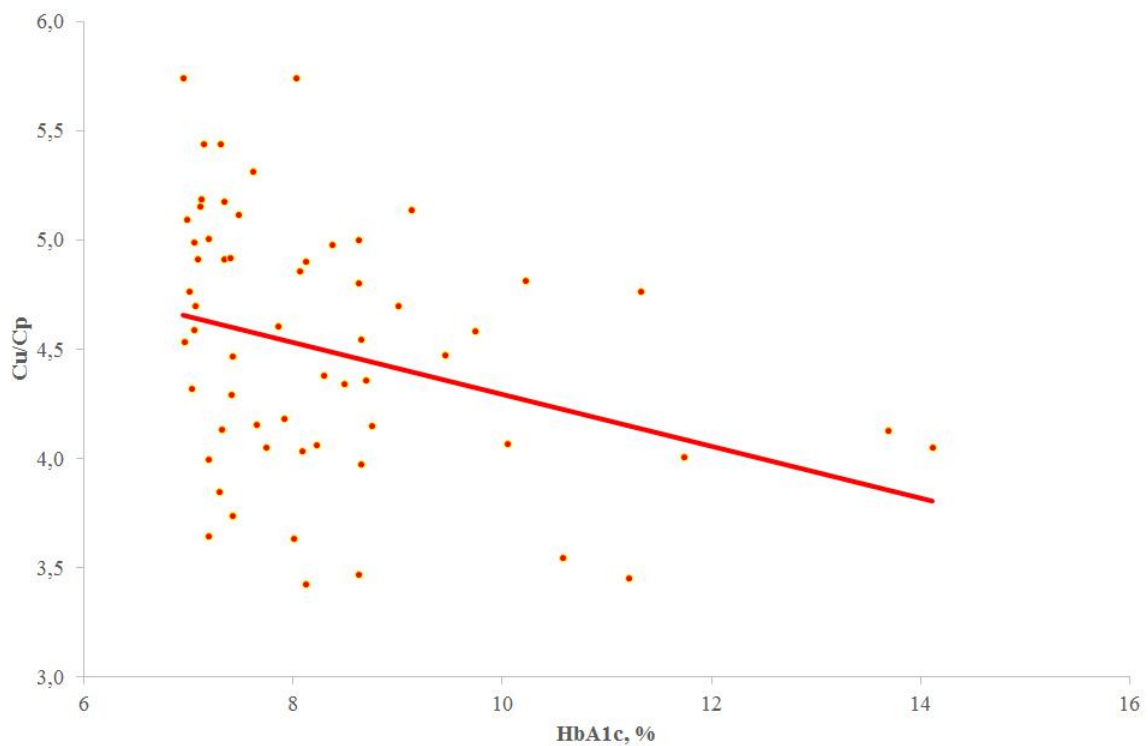


Рисунок 3.12. Диаграмма рассеяния насыщения ионами меди Cr (Cu/Cr) на доле NbA1c в группе 3

В данном разделе мы не рассматриваем корреляции между измеренными параметрами и их отношениями: например, очевидно, что удельная ферроксидазная активность (FerOx/Ср) и отношение ферроксидазной активности Ср к активности Ср в отношении p-PD (FerOx/p-PD) сильно выражены у всех исследованных групп.

3.3 Гликирование церулоплазмينا и трансферрина *in vitro*

Для изучения возможных механизмов наблюдаемых изменений удельной активности Ср и Tf, которые наблюдались при исследовании образцов сыворотки крови, полученных от пациентов с СД2, мы провели модельные эксперименты по гликированию *in vitro* очищенных препаратов Ср и Tf.

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 3.13 представлены результаты определения активности Ср в отношении p-PD, ферроксидазной активности (FerOx) и концентрации фруктозамина в пробах, которые инкубировали при 37°C.

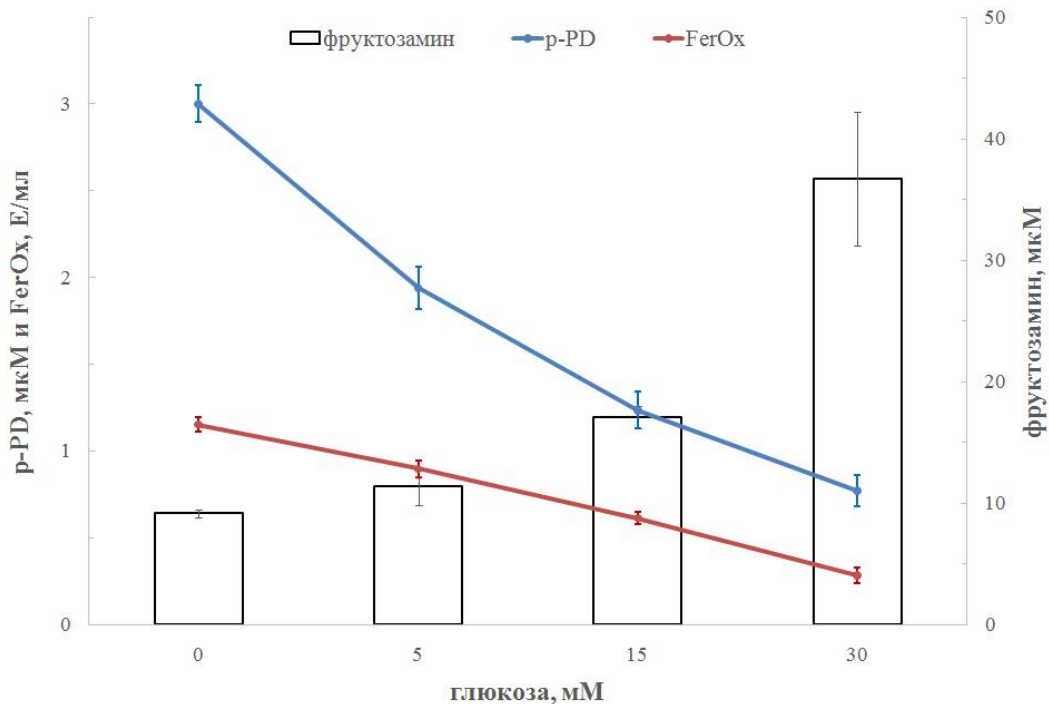


Рисунок 3.13. Активность препаратов 3 мкМ Ср в отношении p-PD, ферроксидазная активность (FerOx) и концентрация фруктозамина после 7 дней инкубации при 37°C в присутствии 0-30 мМ глюкозы, данные представлены в виде среднего значения и доверительного интервала ($\alpha=0,05$)

Как p-PD-активность Ср, так и его феррооксидазная активность снизились в 4 раза в результате недели инкубации при 37°C с максимальной концентрацией глюкозы (30 мМ), при этом концентрация фруктозамина, которая характеризует степень ковалентной модификации белка при гликировании, увеличилась в 4 раза. Следует отметить, что в пробах Ср, которые инкубировались при 4°C, изменения активности Ср и концентрации фруктозамина не превысили 10% вне зависимости от концентрации глюкозы в пробах (данные на рисунке не приводятся).

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 (Рисунок 3.14). На рисунке 3.14 можно видеть, что пробы, которые инкубировали в течение недели при 4°C, практически не изменили оксидазную активность в отношении о-дианизидина, а инкубация при 37°C вызвала снижение активности Ср по мере увеличения концентрации глюкозы в среде.

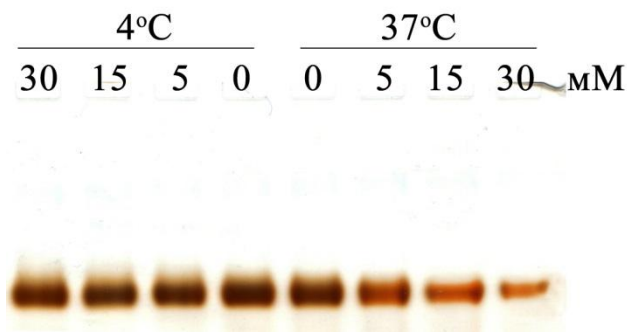


Рисунок 3.14. Электрофореграмма после окрашивания о-дианизидином полиакриламидного геля после диск-электрофореза без детергентов проб, содержащих различные концентрации глюкозы (0-30 мМ) и 3 мкМ церулоплазмينا, которые инкубировали при температурах 4°C и 37°C в течение 7 дней

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 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; Ma, et al., 2022], что в 33 раза превышает использованную нами концентрацию. Такие же результаты были получены при более детальном анализе гликирования очищенных препаратов Tf *in vitro* – только 1 М глюкоза вызвала достоверное снижение

железо-связывающей способности Tf [Van Campenhout, et al., 2004]. Исследование антиоксидантной активности Tf показало, что гликирование *in vitro* в течение 20 дней вызывает снижение активности белка только при концентрации глюкозы выше 50 мМ [Goodarzi, et al., 2010]. Более того, сравнение гликирования Tf в составе сыворотки *in vitro* и Tf в образцах, полученных от пациентов с СД2 с повышенной долей HbA1c, выявило значительные различия профилей гликирования Tf [Helander, et al., 2013]. И хотя результаты нашей работы не выявили снижения железо-связывающей способности Tf при моделировании реально возможных условий гипергликемии, что позволяет предполагать, что Tf не подвергается модификации непосредственно глюкозой, тем не менее, модификация остатков лизина и аргинина другими продуктами конечного гликирования (карбоксиметилом, гидроимидазолоном, фруктозиллом) показана в условиях *in vivo* [Ma, et al., 2022; Silva, et al., 2018].

3.4 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. Нами было выбрано два подхода, сенсор, основанный на эффекте SPR, и равновесная гель-фильтрация, которые позволяли исследовать взаимодействие в широком диапазоне концентраций белков, при том в качестве эталонного было выбрано взаимодействие Ср с Lf. В предварительных опытах нами был получен сенсор с Ср, иммобилизованным на поверхности золотого чипа покрытого карбоксиметилированным декстраном с помощью водорастворимого карбодиимида (см. раздел 2.1.4). Иммобилизация Ср была обусловлена тем обстоятельством, что он присутствует в плазме крови в меньшей концентрации по сравнению с Tf, а также существованием мембраносвязанной изоформы белка (GPI-Ср) [Jeong and David, 2003; Patel and David, 1997]. На рисунке 3.15 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 рН которого совпадает с плазмой крови в норме. Ответ сенсора свидетельствует о связывании исследуемого белка с его поверхностью, при этом 1 RU соответствует связыванию 1 пг белка с 1 мм² поверхности сенсора. Поскольку молекулярные массы Tf и Lf практически совпадают, то для сравнения их взаимодействия с сенсором, на поверхности которого иммобилизован Ср, можно не вводить поправку на различия в молекулярной массе. Следует отметить, что в случае Tf ответ сенсора в течение 50 секунд промывки буфером без белка снижался

практически до 0 RU (Рисунок 3.15, а), а в случае Lf на этом же временном промежутке сохранялось около половины ответа сенсора, достигнутого в момент максимального насыщения поверхности – около 54-59 с от начала инъекции (Рисунок 3.15, б).

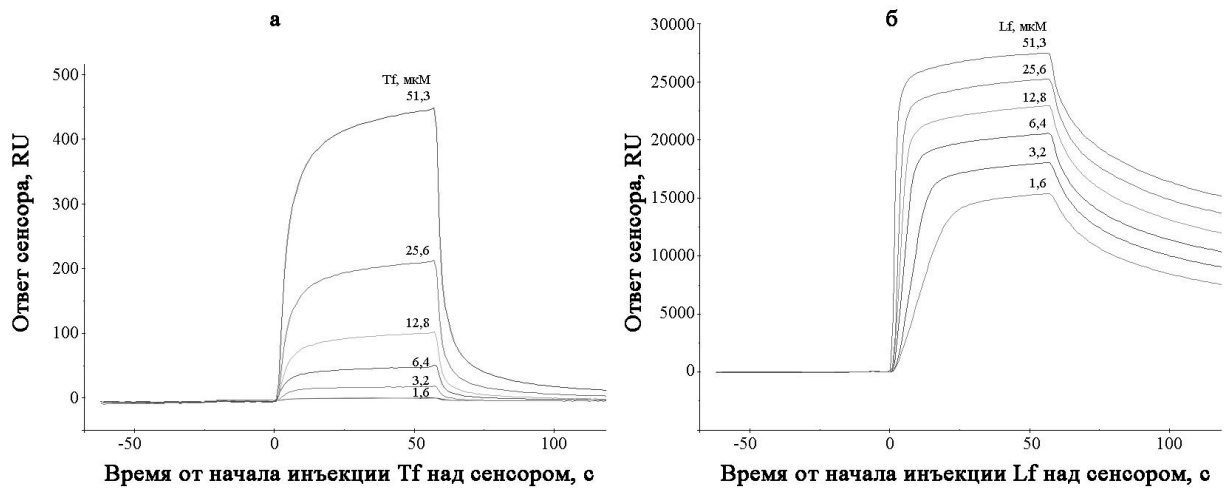


Рисунок 3.15. Серия сенсограмм, характеризующих взаимодействие апо-формы Tf (а) и апо-формы Lf (б) с поверхностью сенсора с иммобилизованным Crp: до 0 с сенсор уравнивали буфером, в течение 60 с инъецировали 1,6-51,3 мкМ растворы белков, а затем буфер

Учитывая принципиальные различия в характере связывания Tf и Lf с Crp, иммобилизованным на сенсоре, для сравнения была выбран момент практически полного насыщения поверхности сенсора – 54 с от момента инъекции аналитов, т.е. Tf либо Lf (Рисунок 3.16).

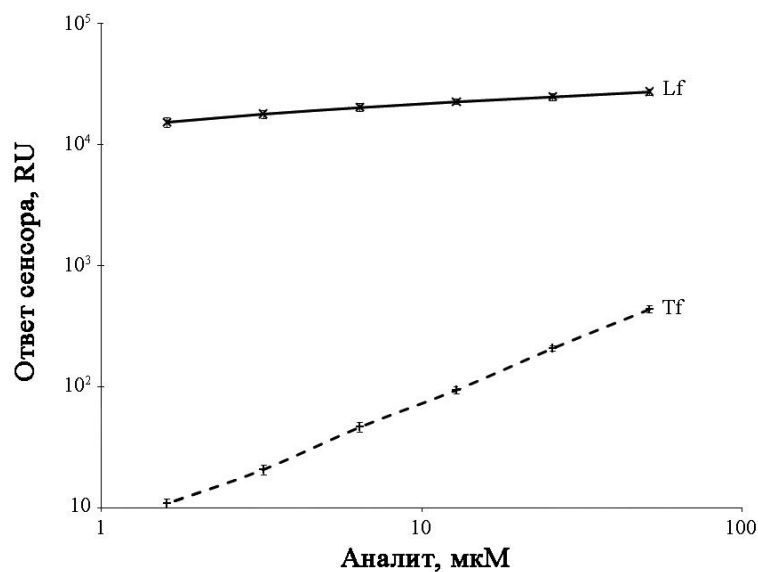


Рисунок 3.16. Зависимости ответа сенсора с иммобилизованным Crp (логарифмическая шкала) на 54 с от момента начала инъекции аналитов от концентрации аналитов (Tf либо Lf, 1,6–51,3 мкМ, логарифмическая шкала). Данные представлены в виде среднего значения и доверительного интервала ($\alpha=0,05$)

На основании кривых связывания и диссоциации Tf и Lf с поверхностью сенсора с иммобилизованным Ср были рассчитаны кинетические параметры взаимодействия белков (таблица 6). Полученное значение константы диссоциации комплекса Ср-Tf как минимум в 24 раза превышает физиологическую концентрацию Tf. При сравнении взаимодействия Ср-Tf с эталонным взаимодействием Ср-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).

Таблица 6. Кинетические параметры взаимодействия апо-формы Tf (апо-формы Lf) и Ср, иммобилизованным на поверхности CM5-чипа, согласно модели связывания 1:1. Данные представлены в виде $X_m \pm SE$.

Аналит	k_a , 1/M×с	k_d , 1/с	R_{max} , 10^3 RU	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					

При исследовании взаимодействия сенсора с холо-формами Tf и Lf (около 100% насыщения ионами железа) не было зафиксировано принципиальных отличий характера сенсограмм и полученных значений кинетических параметров взаимодействия белков с Ср (данные не приводятся). Несмотря на то, что иммобилизация белков на карбоксиметилдекстраниде идет относительно рандомным образом, было высказано предположение, что связывание Ср с чипом могло привести к изменению поверхности, участвующей в контакте с Tf. Также следует подчеркнуть, что зафиксированные сенсограммы были получены путем вычитания сигналов между двумя частями сенсора: с иммобилизованным Ср и без него, следовательно, сигнал в случае связывания Lf был обусловлен его специфическим взаимодействием с Ср, а не с карбоксиметилированным декстраном.

Для изучения взаимодействия Ср и Tf в растворе мы использовали метод равновесной гель-фильтрации. Безусловным преимуществом такого подхода является отсутствие необходимости какой-либо ковалентной модификации исследуемых веществ, а к недостаткам можно отнести довольно большой расход исследуемых компонентов. Последнее обстоятельство обусловлено тем, что колонка для фракционирования комплекса в равновесных условиях должна быть уравновешена раствором, содержащим постоянную концентрацию одного из лигандов. Поскольку физиологическая

концентрация Tf может достигать 50 мкМ, для уравнивания колонки с Sephacryl S-200 HR (200×10 мм) нами был использован 51,3 мкМ Tf, что соответствует – 4 мг/мл. Аналогичный опыт был проведен с такой же концентрацией Lf. Для выполнения данных опытов нами было использовано по 800 мг Tf и Lf.

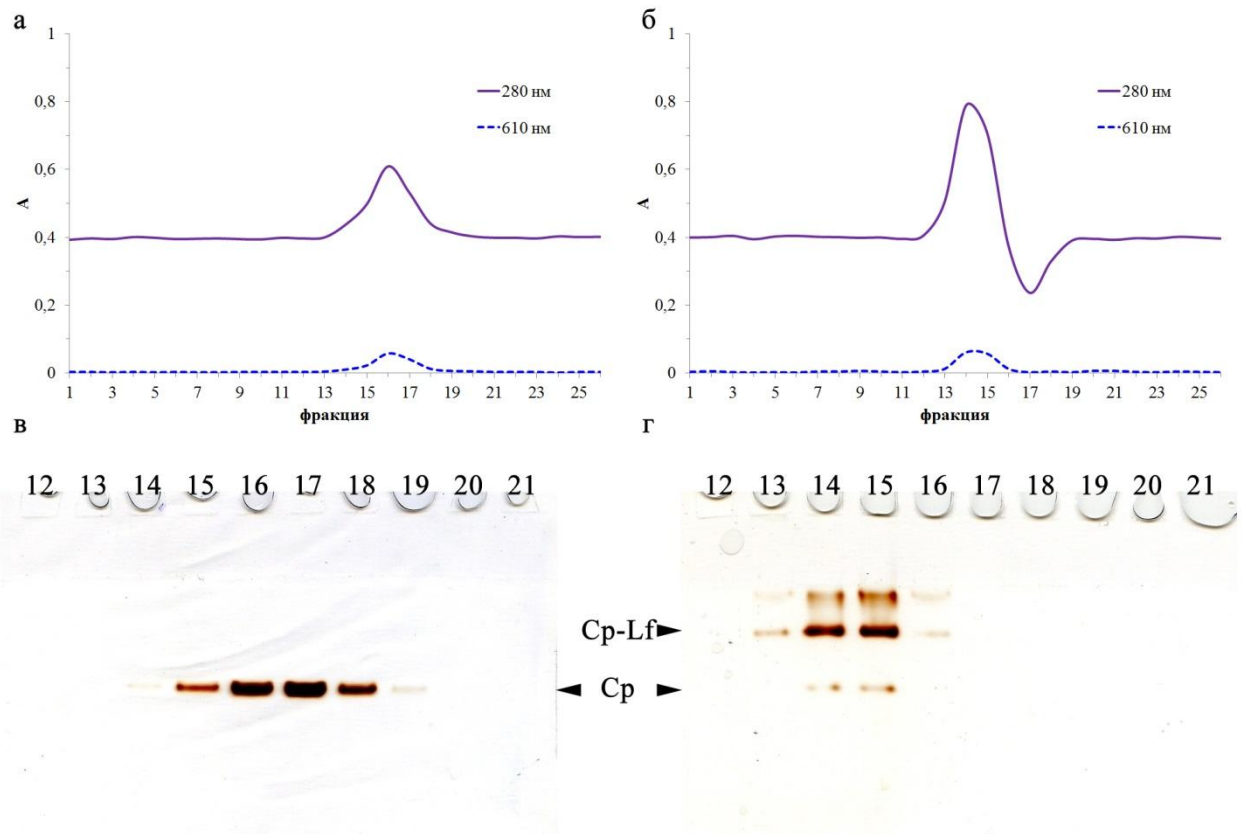


Рисунок 3.17. Профили элюции при равновесной гель-фильтрации (A_{280} – 1-мм оптический путь, A_{610} – 1-см оптический путь). Пробы объемом 200 мкл, нанесенные на колонку, содержали 51,3 мкМ апо-формы Tf и 30 мкМ Cr (а) либо 51,3 мкМ апо-формы Lf и 30 мкМ Cr (б). Белки были элюированы со скоростью 0,1 мл/мин 100 мМ NaCl, 10 мМ Hepes-NaOH, pH 7,4, содержащим 51,3 мкМ Tf (а) либо Lf (б); в, г – полиакриламидные гели окрашенные *o*-дианизидином после диск-электрофореза фракций (дорожки 12–21), полученных при равновесной гель-фильтрации с добавлением Tf (в) либо Lf (г) в элюент; положение Cr и комплекса Cr–Lf указано стрелками

До начала экспериментов на колонке, уравновешенной постоянной концентрацией Tf либо Lf, нами были определены объемы, в которых элюируются по отдельности Cr, Tf и Lf, при этом для элюции использовали буфер, содержащий 100 мМ NaCl, 10 мМ Hepes-NaOH, pH 7,4, который близок по составу к буферу, использованному нами в опытах с SPR-сенсором. В таких условиях 200 мкл образца Cr элюировалось в объеме 8 мл, а совпадающие по молекулярной массе Tf и Lf элюировали в одинаковом объеме – 8,5 мл. Смесь Cr и Lf с соотношением 1:1 (моль/моль) элюировалась с колонки как единичный

симметричный пик в объеме 7 мл, а смесь Ср и Tf с соотношением 1:1 (моль/моль) элюировалась как два отдельных пика в объемах 8 мл и 8,5 мл, соответственно. Та же колонка была уравновешена 51,3 мкМ Tf в 100 мМ NaCl, 10 мМ Hepes-NaOH, pH 7,4, однако ситуация с разделением белков повторилась: при нанесении 200 мкл смеси, которая содержала 51,3 мкМ Tf и 30 мкМ Ср, при промывке колонки 51,3 мкМ Tf объем элюции Ср соответствовал 8 мл (фракция № 16, пик по A_{610} , которое обусловлено ионами меди I типа в Ср), более того поглощение элюата после пика Ср при длине волны 280 нм было таким же, как базовое, соответствующее 51,3 мкМ Tf. Полученный профиль элюции (Рисунок 3.17, а) однозначно свидетельствовал об отсутствии взаимодействия между Ср и Tf даже в равновесных условиях, наиболее благоприятных для образования даже слабых взаимодействий. Следует отметить, что в данном случае концентрация Ср была в 10 раз выше физиологической и в 3 раза выше той, что обнаруживается при острой фазе воспаления.

Для сравнения описанного выше опыта с эталонным взаимодействием между Ср и Lf эта же колонка была тщательно отмыта буфером, а затем уравновешена 51,3 мкМ Lf в 100 мМ NaCl, 10 мМ Hepes-NaOH, pH 7,4. После нанесения на колонку 200 мкл смеси, которая содержала 51,3 мкМ Lf и 30 мкМ Ср, при промывке колонки 51,3 мкМ Lf в объеме 7 мл вышел пик комплекса Ср-Lf (фракция № 14, наряду с пиком по A_{610} был зафиксирован большой по площади пик по A_{280}), а после этого пика поглощение при 280 нм уменьшилось ниже базовой линии (8,5 мл – фракция № 17). Такой профиль элюции (Рисунок 3.17, б) является убедительным доказательством образования комплекса Ср-Lf – поскольку снижение поглощения уравновешивающего Lf-содержавшего раствора, обусловлено тем, что Lf был включен в комплекс с Ср и его недостаток выразился в снижении базовой линии, т.е. в зеркально отраженном пике на профиле элюции. Поглощение данного минимума в точности совпадало с объемом элюции, который соответствовал объему элюции Lf, определенному ранее.

В качестве иллюстрации комплексообразования между Lf и Ср фракции, полученные при равновесной гель-фильтрации были проанализированы с помощью диск-электрофореза без детергентов. Действительно, Ср-содержащие фракции в присутствии Lf характеризовались меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с фракциями, полученными при элюции Tf-содержащим буфером (Рисунок 3.17, в, г).

На основании проведенных опытов можно заключить, что, несмотря на тесную функциональную связь Ср и Tf, а также ряд публикаций, посвященных обнаружению взаимодействия между Ср и Tf с помощью методов флуоресцентной спектроскопии [На-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 и при гель-фильтрации мы не наблюдали существенного связывания Ср и Tf.

3.5 Анализ изменений метаболизма железа у крыс при индуцированной стрептозотоцином гипергликемии

Для подтверждения изменений обмена железа у крыс использовали модель гипергликемии, которую индуцировали инъекцией стрептозотоцина. Небольшой объем крови, который можно было получить от крыс, не позволил измерить весь список биохимических параметров, характеризующих обмен железа, использованный для условно здоровых доноров и пациентов с различной степенью компенсации гипергликемии. В связи с этим, были выбраны только некоторые параметры, результаты их сопоставления представлены на рисунке 3.18 и в таблице 7. Для дополнительной характеристики обмена железа нами был специально разработан иммуноферментный анализ концентрации ферритина у крыс. Учитывая небольшой объем групп, был использован непараметрический критерий Манна-Уитни для сравнения отличий в группах.

Для подтверждения того, что выявленные изменения обмена железа не вызваны случайными ошибками при рандомизации животных, нами была измерена концентрация гемоглобина, которая не отличалась у животных контрольной группы и при моделировании гипергликемии (Рисунок 3.18, I).

Развитие гипергликемии было подтверждено по увеличению концентрации глюкозы и фруктозамина (Рисунок 3.18, II и III, $p=0,000$ и $p=0,001$, соответственно). Интересным оказалось то, что хотя ферроксидазная и р-PD-оксидазная активности Ср не отличались (Рисунок 3.18, V и VI), было обнаружено повышение концентрации Ср в группе крыс с моделью гипергликемии, а удельная ферроксидазная и р-PD-оксидазная активности Ср напротив снизились (Рисунок 3.18, VII и VIII, $p=0,0003$ и $p=0,0003$, соответственно).

Полученные данные согласуются с данными пациентов с различной степенью компенсации гипергликемии. Показано снижение концентрации ферритина (Рисунок 3.18, IV, $p=0,028$). Поскольку концентрация ферритина увеличивается в острую фазу воспаления, напротив, снижение концентрации данного показателя косвенно показывает, что изменения обмена железа у крыс с гипергликемией являются результатом хронического воспаления.

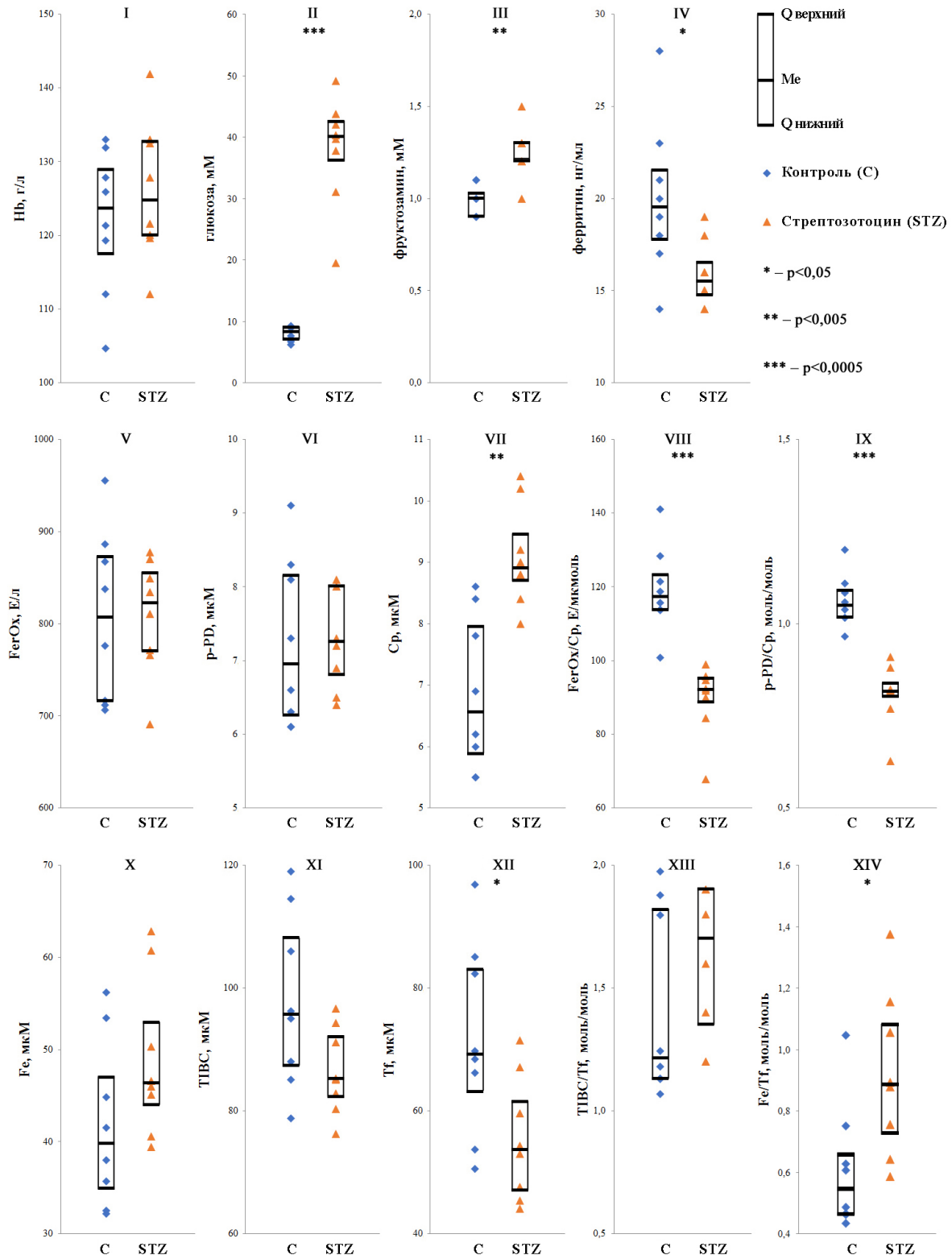


Рисунок 3.18. Сравнение концентрации гемоглобина (I), глюкозы (II), фруктозамина (III), ферритина (IV), Ср (VII), Fe (X), Tf (XII), ферроксидазной (V) и p-PD-оксидазной активностей Ср (VI), в том числе удельных (VIII и IX), TIBC (XI), удельных активностей Tf (XIII и XIV) у крыс в контрольной группе (C) и крыс, получавших стрептозотозин (STZ)

Таблица 7. Биохимические показатели и значимость их различий в контрольной группе крыс и группе крыс, получивших инъекцию STZ.

Показатель	Ме (Q1 – Q2)		Уровень значимости, p
	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 (FeOx), 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 (Cp), мкМ	6,6 (5,9 – 8,0)	8,9 (8,7 – 9,5)	0,001
FeOx/Cp, Е/мкмоль	117,1 (113,7 – 123,2)	92 (88,6 – 95,0)	0,000
p-PD/Cp, 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 (ТІВС), 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
ТІВС/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			

Снижение уровня ферритина в сыворотке может быть опосредовано изменениями концентрации гепцидина, что может нарушать всасывание железа из энтероцитов двенадцатиперстной кишки и высвобождение железа из макрофагов, ограничивая доступность железа, особенно при заболеваниях с усилением воспаления.

Показано снижение концентрации Tf (Рисунок 3.18, IV и XII, и $p=0,0499$, соответственно). Известно, что концентрация трансферрина снижается при остром воспалении, а при диабете увеличивается его потеря с мочой, нарушается его синтез в печени.

Нами не было выявлено изменений концентрации Fe и ТІВС (Рисунок 3.18, X и XI), что согласуется с данными, полученными при исследовании этих параметров у условно здоровых доноров и пациентов с СД2 (Таблица 1). Однако удельная активность Tf, охарактеризованная как отношение ТІВС/Tf, не изменилась при моделировании гипергликемии у крыс (Рисунок 3.18, XIII), а отношение Fe/Tf увеличилось при гипергликемии (Рисунок 3.18, XIV). Различия в разнонаправленном изменении концентрации Tf и отношении Fe/Tf у пациентов с СД2 и крыс с STZ-моделью гипергликемии можно объяснить большими компенсаторными возможностями антиоксидантных систем, признаком которых, в частности, является выявленное нами значительное (в 1,5 раза) увеличение концентрации Ср у крыс STZ-модели, которое нивелирует снижение удельной активности Ср, что в свою очередь может компенсировать снижение концентрации Tf, направленное на снижение биодоступности железа при STZ-модели гипергликемии у крыс. Не исключено, что обнаруженные разнонаправленные изменения концентрации Ср и Tf могут отражать развитие воспаления, характерного для стрептозотоциновой модели. Поскольку Ср у крыс имеет дополнительный сайт связывания иона меди, что ведет к усилению его супероксиддисмутазной активности по сравнению с человеком [Samyгина, et al., 2017], можно предположить, что механизм защиты от окислительного стресса, ассоциированного с воспалением, у крыс выражен сильнее. Недавно было показано, что развитие воспаления, характерное для стрептозотоциновой модели, сопровождается увеличением активности фермента нейтрофильных лейкоцитов, миелопероксидазы, которая коррелировала с концентрацией карбониллов в белках [Stocker, et al., 2017].

Следует отметить, что ТІВС в нормальных условиях определяется в основном концентрацией Tf, снижение концентрации Tf у крыс с моделью гипергликемии должно приводить к снижению ТІВС, однако нами не было показано изменений ТІВС. Неизменность ТІВС на фоне снижения концентрации Tf может свидетельствовать об увеличении нетрансферрин-обусловленной железосвязывающей способности сыворотки крови. Известно, что в нормальных условиях нетрансферрин-связанное железо (NTBI) связано с низкомолекулярными лигандами (цитрат, ацетат) либо карбоновыми группами альбумина [Hider, et al., 2002; Matias, et al., 2017; Silva & Rangel, 2022]. Показано, что NTBI увеличивается у пациентов с СД2 [Lee, et al., 2006] при увеличении насыщения Tf

более 50%, а также у здоровых людей при увеличении насыщения Tf более 70%. Показано [Hiroshi, et al., 2014], что бычий сывороточный альбумин (БСА) образует растворимый железосвязывающий комплекс путем растворения Fe^{3+} в присутствии ионов гидрокарбоната при нейтральном pH, при этом молекулярное отношение железа к БСА аналогично отношению железа к лактоферрину, т. о. авторы сравнивают железосвязывающую способность БСА с аналогичной способностью лактоферрина.

Полученные нами данные не в полной мере согласуются с данными других авторов. Так показано недостоверное увеличение концентрации железа у крыс STZ-модели [Zhang, et al., 2021], что согласуется с полученными нами данными, однако концентрации ферритина и трансферрина недостоверно незначительно снижаются, что противоречит полученным нами результатам. В другой работе у крыс STZ-модели показано значительное увеличение концентрации железа (в 3 раза), ТIBC в 2 раза, насыщения трансферрина на 20% [Silva, et al., 2012], что противоречит данным нашей работы, однако при этом уровень экспрессии мРНК ферритина в печени снижался на 25 %, мРНК трансферрина увеличивался в 2,5 раза, что косвенно подтверждается полученными нами данными на уровне белков ферритина и трансферрина. В еще одной работе показаны сходные с нашими результатами снижение концентрации трансферрина в 2 раза и повышение концентрации ферритина в 2 раза [Saravanan, et al., 2013], однако концентрации железа у крыс STZ-модели значительно (в 2 раза) увеличивается. В ряде работ показано снижение и концентрации трансферрина, и концентрации железа [Khorasani, et al., 2019; Cen, et al., 2022]. Противоречивость полученных результатов может быть обусловлена отличиями в использовании объектов исследования (крысы линии Wistar и др.), концентрацией вводимого STZ, длительностью эксперимента (от 1 недели до полугода), включением дополнительных факторов (высокожировая диета).

Сравнение изменения показателей железа у пациентов с различной степенью компенсации гипергликемии и у крыс с STZ-моделью гипергликемии показывает сходные нарушения функционирования участников обмена железа, в частности, снижение активности Ср, но не Tf. (Таблица 8).

Учитывая, что Lf обладает способностью индуцировать синтез Ср, мы предположили, что введение Lf крысам с STZ-индуцированной гипергликемией будет препятствовать нарушениям обмена железа, сопутствующим развитию сахарного диабета 2 типа. Дополнительным аргументом введения Lf животным является снижение концентрации Tf, которое наблюдалось при гипергликемии у крыс. Хотя изменение функциональной активности Tf качественно различалось у пациентов с СД2 и крыс с гипергликемией, подход введения гомолога Tf – лактоферрина представляется

оправданным. Исходя из того, что доза Lf, введенного крысам в эксперименте, никогда не достигнет концентрации Tf в плазме крови, но при этом Lf образует прочный комплекс с Ср и увеличивает его ферроксидазную активность, нами были выбраны дозы Lf 50 мг/кг и 250 мг/кг, которые по нашим расчетам вызовут вовлечение практически всего Ср в комплекс с экзогенным Lf.

Таблица 8. Сравнение изменения показателей железа у пациентов с различной степенью компенсации гипергликемии и у крыс с STZ-моделью гипергликемии.

	Крысы	Пациенты с СД2	
	STZ-модель	2-ая группа	3-ая группа
[Cp], мкМ	↑	=	↑
FerOx/Cp, Е/мкмоль	↓	↓	↓
p-PD/Cp, моль/моль	↓	↓	↓
[Fe], мкМ	=	=	=
TIBC, мкМ	=	=	=
[Tf], мкМ	↓	↑	↑
TIBC/Tf, моль/моль	↑	↓	↓
Fe/Tf, моль/моль	↑	↓	↓

Обозначения: 2-ая группа – пациенты с СД2 с компенсированной гипергликемией; 3-ая группа - пациенты с СД2 с некомпенсированной гипергликемией; ↑ - повышение значений, ↓ - снижение значений; = - без изменений значений.

С целью исследования терапевтического и профилактического потенциала Lf при моделировании STZ-индуцированной гипергликемии у крыс были проанализированы такие параметры как концентрация глюкозы натощак и удельная ферроксидазная активность Ср в образцах плазмы крови в день инъекции STZ (0 день) и через 35 дней (Таблица 9).

При терапевтической схеме введения Lf (Lf, 50 мг/кг, 1-5 день, см. раздел 2.3.1) хотя и наблюдался антигликемический эффект Lf, однако его амплитуда не удовлетворяла требованиям к эффективному антигликемическому препарату. С учетом этого для профилактической схемы доза Lf была увеличена в 5 раз – 250 мг/кг (Lf, 250 мг/кг, -5-0 день, см. раздел 2.3.1). Антигликемический эффект вопреки нашим ожиданиям был менее выраженным, чем при терапевтической схеме введения. Наиболее выраженные эффекты Lf были получены при смешанной схеме введения (Lf, 250 мг/кг, 5, -3, -1, 2, 4, 6, 8 дни). Удельная ферроксидазная активность Ср, снижавшаяся у крыс контрольных групп, была

удобным критерием оценки защитного действия Lf. В соответствии с изменениями концентрации глюкозы натошак на 35 день защитное действие Lf было наиболее выражено при смешанной схеме введения (см. Рисунок 3.19).

Таблица 9. Биохимические показатели (Me, Q1-Q2) крови крыс, получавших Lf по трем схемам, и контрольных крыс до (0 день) и на 35 день после STZ-индуцированной гипергликемии у крыс.

Показатель		Глюкоза, мМ		FerOx/Ср, Е/мкМ	
		0	35	0	35
Терапевтическая схема Lf, 50 мг/кг, 1-5 день	Опыт n = 8	7,2 (6,7-7,8)	28,9 (27,8-29,8)	119 (116-122)	81 (73-89)
	Контроль n=8	7,9 (6,9-8,3)	37,7 (36,6-39,9)	118 (114-123)	123 (117-125)
Профилактическая схема Lf, 250 мг/кг, -5-0 день	Опыт n=8	7,9 (7,1-8,0)	32,1 (30,8-33,1)	115 (107-120)	108 (103-111)
	Контроль n=8	7,9 (6,9-8,3)	38,2 (36,9-39,9)	120 (116-128)	78 (71-85)
Смешанная схема Lf, 250 мг/кг, 5, -3, -1, 2, 4, 6, 8 дни	Опыт n=7	7,3 (7,1-7,7)	26,4 (25,6-27)	123 (113-129)	81 (73-89)
	Контроль n=7	7,7 (7,4-8,1)	39,4 (37,4-40,6)	125 (118-126)	116 (108-119)

В таблице 10 представлены изменения концентрации SH-групп и активности глутатионпероксидазы (GSH-Px) и глутатион-S-трансферазы (GST) в образцах плазмы крови и лизатах эритроцитов от дня инъекции STZ (0 день) и к 35 дню после введения STZ крысам контрольных групп и групп, получавших Lf.

Наиболее яркие изменения параметров, характеризующих окислительный стресс, представлены на рисунке 3.19. 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. 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. 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 (Рисунок 3.19).

Таблица 10. Биохимические показатели (Me, Q1-Q2) крови крыс, получавших Lf по трем схемам, и контрольных крыс до (0 день) и на 35 день после STZ-индуцированной гипергликемии.

Показатель		SH-группы, мкМ		GSH-Px мМ/мин/г Hb		GST, мкМ/мин/г Hb	
		0	35	0	35	0	35
Терапевтическая схема Lf, 50 мг/кг, 1-5 день	Контроль n=8	507 (489-513)	406 (389-416)	7,2 (7,2-7,3)	6,3 (5,8-6,7)	1,0 (0,9-1,1)	1,6 (1,4-1,7)
	Опыт n = 8	508 (489-513)	471 (456-517)	7,3 (6,9-7,9)	7,4 (7,2-7,4)	1,0 (1,0-1,2)	1,1 (1,0-1,1)
Профилактическая схема Lf, 250 мг/кг, -5-0 день	Контроль n=8	510 (506-514)	344 (319-375)	7,1 (7,0-7,1)	6,1 (5,7-6,2)	1,1 (1,0-1,1)	1,4 (1,3-1,7)
	Опыт n=8	550 (541-559)	456 (438-463)	7,5 (7,0-7,2)	7,3 (7,1-7,8)	1,2 (1,0-1,2)	1,2 (1,2-1,3)
Смешанная схема Lf, 250 мг/кг, 5, -3, -1, 2, 4, 6, 8 дни	Контроль n=7	502 (491-514)	332 (312-368)	7,3 (7,1-7,5)	6,2 (5,6-6,4)	1,1 (1,0-1,2)	1,5 (1,3-1,6)
	Опыт n=7	539 (527-541)	481 (478-487)	7,3 (7,1-7,9)	7,3 (7,1-7,5)	1,1 (1,0-1,2)	1,0 (0,8-1,0)

Тот факт, что Lf помимо антигликемического эффекта препятствует снижению удельной ферроксидазной активности Ср, находится в соответствии с нормализацией концентрации SH-групп. Способность Lf нивелировать снижение активности GSH-Px, наблюдаемое при STZ-индуцированной гипергликемии, может быть следствием влияния Lf на функционирование транскрипционного фактора Nrf2. Мишенями Nrf2 являются гены ферментов, участвующих в поддержании концентрации восстановленного глутатиона. В целом полученные результаты согласуются с наблюдениями, выполненными на пациентах с метаболическим синдромом, получавшим Lf помимо метформина [Mohamed, et al., 2018]. Независимо нами было показано, что Lf в апо-форме индуцирует транслокацию Nrf2 в ядро, насыщенная форма Lf таким эффектом не обладает [Zakharova, et al., 2018]. Следует отметить наличие отрицательной обратной связи: увеличение ферроксидазной активности Ср вызывает насыщение апо-формы Lf железом, а

такая форма Lf теряет способность активировать Nrf2-зависимые гены. Т.о. система гомеостаза железа регулирует защитные антиоксидатные свойства Lf.

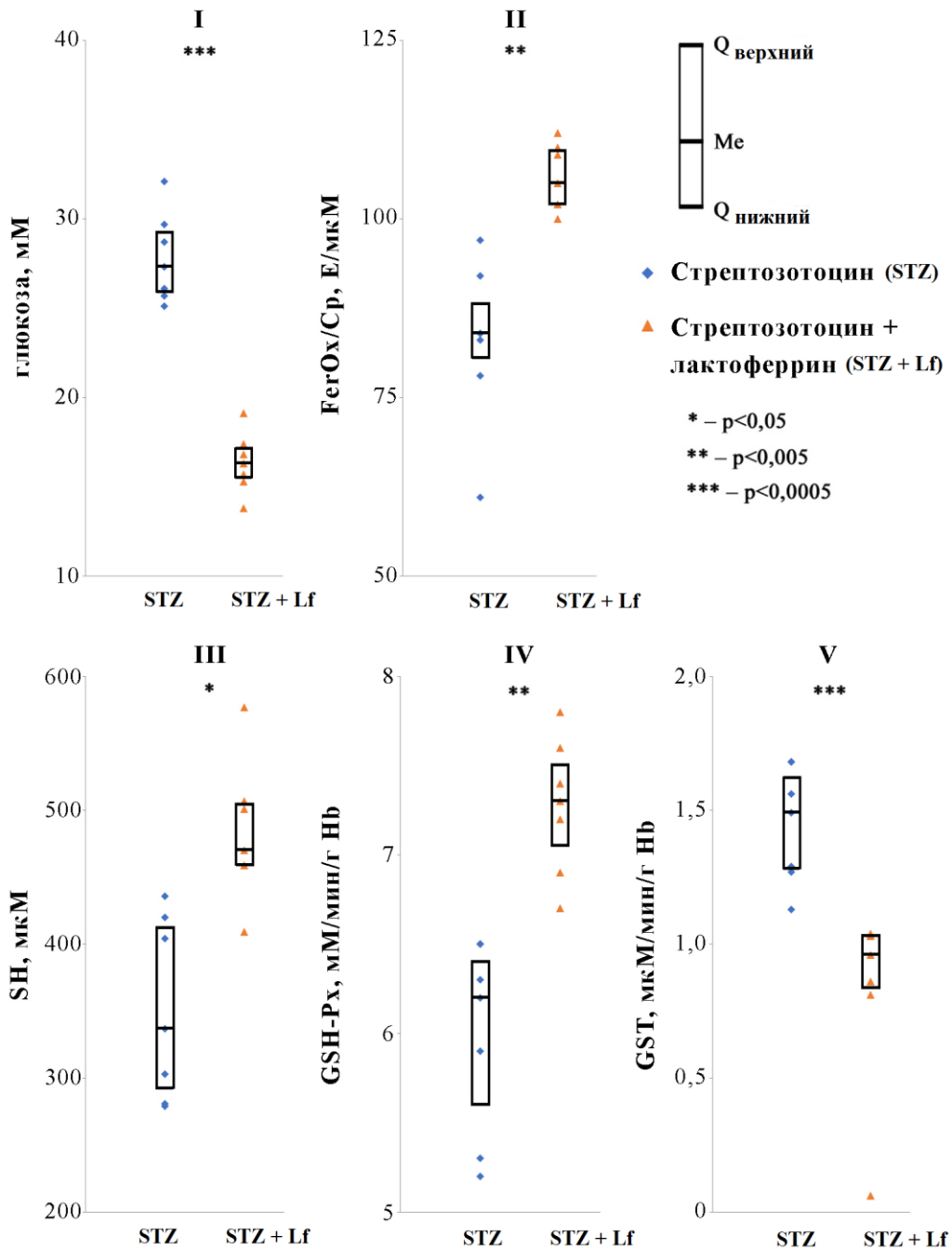


Рисунок 3.19. Сравнение на 35 день после инъекции STZ концентрации глюкозы (I), удельной ферроксидазной активности Ср (II), концентрации SH-групп (III), активностей глутатионпероксидазы (GSH-Px, IV) и глутатион-S-трансферазы (GST, V) у крыс контрольной группы (STZ) и крыс опытной группы, получавших Lf по смешанной схеме (STZ + Lf). Данные представлены как Q_{нижний}, Me, Q_{верхний}.

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 (Таблица 1). Эти изменения были подтверждены с помощью регрессионного анализа зависимости концентрации ионов меди от концентрации Ср (Таблица 3). Отношение ТIBC 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 (Таблица 1, Рисунок 3.5). Эти результаты подтвердились достоверным изменением коэффициентов в уравнении одномерной линейной регрессии насыщения Tf железом (Fe/Tf) и отношения концентрации железа к ТIBC (Fe/ТIBC) (Таблица 5), что позволило выявить изменение железо-связывающей функции Tf при развитии СД2.

Мы предположили, что нарушение регуляции экспрессии гена Tf опосредованное гликированием регуляторов NIF-зависимого ответа на железо-дефицит может объяснить изменение связей между Fe и Tf по мере усиления степени гипергликемии (Рисунок 3.8). 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 (Рисунок 3.13). Сравнения взаимодействия Ср с Tf и Ср с катионным гомологом Tf – лактоферрином, мы пришли к выводу, что последний образует прочный комплекс с Ср (Таблица 6). 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 (Таблица 7). 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, опосредованной Lf коррекции гипергликемии, снижения ферроксидазной активности Ср и концентрации SH-групп

(Рисунок 3.19) 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 NIF-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 СОКРАЩЕНИЙ

AGE – продукты конечного гликирования	Ср – церулоплазмин
Akt – серин-треониновая протеинкиназа	CFD1 – (Cytosolic Fe-S cluster deficient 1) белок участвующий в синтезе Fe-S кластеров
B	CHOP – белок-гомолог C/EBP
ABCB10 – (ATP-binding cassette transporters) член суперсемейства транспортеров, использующих энергию ATP	CUL1 – куллин 1DMT1, транспортер двухвалентных металлов
ALAS2 – синтаза аминолевулиновой кислоты эритроцитов	Dcytb – дуоденальный цитохром b
Alk2 и Alk3 – (рецептор активина – подобная киназа) рецепторы BMP типа I	ER – эндоплазматический ретикулум
ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2	ERK – киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом
ACTRIIA – (рецептор активина II типа) рецептор BMP II типа	ERFE – эритроферрон
ATP7A – медь-транспортирующая АТФ-аза Р типа, белок Менкеса	EPO – эритропоэтин
ATP7B – медь-транспортирующая АТФ-аза Р типа, белок Вильсона	EPOR – рецептор эритропоэтина
BMP – морфогенетический белок костей	FOXO1 – (forkhead box protein O1) транскрипционный фактор
BMPRII - рецепторы BMP типа II	опосредующий действие инсулина
diBr-PAESA – 3,5-дибромо-2-пиридилазо-N-этил-N-сульфопропиланилин	Ft (ФРТ) – ферритин
CD – мембранный белок на поверхности клеток миелоидного ряда, определяющий дифференцировку клетки	FtH – тяжелая H-цепь ферритина
CREB (H) – циклический-АМФ-чувствительный элемент связывающий белок (H), транскрипционный фактор	FtL – легкая L-цепь ферритина
C/EBP – ССААТ-энхансер связывающий белок	FPN (IREG 1, SLC40A1) – ферропортин
	FC – феррохелатаза
	F-DAOS – N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3,5-диметокси-4-фтороанилин
	FLVCR – белок, связанный с рецептором вируса подгруппы С лейкемии кошек, транспортер гема
	FBXL5 – (F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 5) белок участвующий в образовании SCF-E3-убиквитин-лигазного комплекса
	GTP – гуанидинтрифосфат

- GPI – гликозилфосфатидилинозитол
- GLUT – транспортер глюкозы
- GDF – фактор дифференциации роста
- HEPES – N,N-бис(2-гидроксиэтил-2-аминоэтансульфоновая) кислота
- HIF – гипоксия-индуцибельный фактор
- HDL – липопротеины высокой плотности
- HOX – гемоксигеназа
- HH – наследственный гемохроматоз
- HFE – белок наследственного гемохроматоза
- (s)(m) HJV – (растворимый) (мембранный) гемоювелин
- HDAOS – N-(2-гидрокси-3-сульфо-пропил)-3,5-диметоксианилин
- HAMP – гепцидин
- Hr – гестин
- (pre-) Hb (ГБ) (A1c) – (пре-) гемоглобин (A1c)
- IFN - интерферон
- IRS – субстрат инсулинового рецептора
- IgG – иммуноглобулин G
- IL – интерлейкин
- IRP – железо-регулирующий белок
- IRE – железо-чувствительный элемент
- JAK – янус-киназа
- CoA (CoA) – коэнзим А
- LDL – липопротеины низкой плотности
- LRP1 (LDL-receptor related protein 1) – белок, родственник LDL-рецептору
- (apo)Lf – (апо)лактоферрин
- MAPK – митоген-активируемая киназа
- Mfrn (SLC25A37) – митоферрин
- MODY – диабет зрелого типа у молодых
- MHC I – белки главного комплекса гистосовместимости I
- MEK – киназа киназы ERK
- MT-2 (TMPRSS6) – трансмембранная сериновая протеаза II типа
- mTORC1/2 – Сер/Тре протеинкиназный комплекс 1/2 механистической мишени рапамицина
- MafA – транскрипционный фактор экспрессии гена инсулина
- NF-κB – транскрипционный фактор κB
- NAD(P)(H) – никотинамидаденин-динуклеотид(фосфат) (восстановленный)
- NTBI – нетрансферрин-связанное железо
- NCOA4 – коактиватор ядерного рецептора 4
- NBP35 (Nucleotide binding protein 35) – белок участвующий в синтезе Fe-S кластеров
- Nitro-PAPS - 2-(5-нитро-2-пиридалазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенол
- NTHL – ДНК N-гликозилаза, член суперсемейства эндонуклеаз III
- NRAMP1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1) – переносчик двухвалентных катионов в макрофагах
- p-PD (п-ФД) – пара-фенилендиамин
- PARP – поли(АДФ)-рибозо-полимераза
- PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
- PDX- транскрипционный фактор промотора инсулина
- PCBP1 – поли (rC)-РНК связывающий белок 1

- PGC-1 – коактиватор альфа 1 гамма-рецептора пролиферации пероксисом
- PI3K – фосфоинозитид-3-киназа
- R-SMAD – рецептор-регулируемые SMAD- белки
- Ras – белок суперсемейства малых GTPаз
- Raf – прото-онкоген серин-треониновая киназа
- RBX1 – (RING-box protein 1) белок взаимодействующий с куллином в SCF-E3-убиквитин-лигазном комплексе
- SMAD (Similar to Mothers Against Decapentaplegic) – белки- кофакторы транскрипции
- STAT – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции
- Scara5 (scavenger receptor, member 5) – рецептор для связывания L-ферритина
- SKP1 – (S-phase kinase-associated protein 1) белок участвующий в образовании SCF-E3-убиквитин-лигазного комплекса
- SDS – додецилсульфатат натрия
- SPR – поверхностный плазмонный резонанс
- RU - резонансная единица
- STEAP – (transmembrane epithelial antigen protein-3 ferric reductase (steap) family) ферроредуктаза
- SLC48A1 (HRG1) – транспортер гема
- TIM-2 (T cell immunoglobulin mucin) – рецептор для связывания H-ферритина
- (s)TfR – (растворимый) рецептор трансферрина
- (holo)(apo) Tf – (холо) (апо) трансферрин
- TNF (α) – фактор некроза опухолей (α)
- TWSG1 – гомолог 1 белка скрученной гастрюляции
- UTR – нетраслируемый регион мРНК
- UCP(1) – митохондриальный разобщающий белок (1) (термогенин)
- ZIP 14 – переносчик двухвалентных ионов (цинка и нетрансферрин-связанного Fe)
- АТФ (АТР) – аденозинтрифосфат
- АДФ (ADP) – аденозиндифосфат
- а.о. –аминокислотные остатки
- АФК – активные формы кислорода
- АС – антисыворотка
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИНЗСД (СД2) – инсулиннезависимый сахарный диабет
- ЛПЖ – лабильный пул железа
- ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности
- НСТ – нитротетразолий синий
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- (м)РНК – (матричная)рибонуклеиновая кислота
- STZ – стрептозотоцин
- СРБ – С-реактивный белок
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- ТЕМЕД - N,N,N',N'-тетраметилэтилен-диамин
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- ЭДТА – этилентетрауксусная кислота
- ЭФ – электрофоретическое разделение
- ОН \cdot – гидроксильный радикал
- O $_2^{\cdot-}$ – супероксиданион радикал

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилова А.Н., Хмара Н.Ф. Определение активности глутатион пероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстрата // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 721-724.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Федеральная целевая программа «Сахарный Диабет» Методические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации Федеральный диабетологический центр РФ Российская Академия медицинских наук Эндокринологический научный центр РАМН. – Москва. – 2002.
3. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021 // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24. – № 3. – С. 204-221.
4. Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Горбунова В.Н., Шавловский М.М. Выделение и физико-химические характеристики церулоплазмينا крысы // Биохимия. – 1983. – Т. 48. - С. 1709-1720.
5. Соколов А.В., Костевич В.А., Романико Д.Н., Захарова Е.Т. Васильев В.Б. Двухстадийный метод получения церулоплазмينا на основе его взаимодействия с неомицином // Биохимия. – 2012. - Т. 77 (6). - С. 775-784.
6. Патолофизиология том 1. Общая патолофизиология: учебник для медвузов / Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. издание 2-е исправленное, ЭЛБИ, 2001.
7. Перутц М. Молекула гемоглобина // Молекулы и клетки - М.: Наука. - 1966. - с. 7-29.
8. Фельдкорен Б.Н., Осипова Е.Н., Коцегуб Г.П., Рогозкин В.А. Исследование параметров метода гликизилированных белков сыворотки крови // Лаб. Дело. – 1988. – Т. 5. – С. 56-59.
9. Abboud S., Haile D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275(26). – P. 19906-19912.
10. Abe A., Yamashita S., Noma A. Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum // Clin. Chem. – 1989. – V. 35(4). – P. 552-554.
11. Abebe T., Bogachus L., Vegaraju A. K., Robertson R. P. Evolution of nrf2 gene expression in hit-t15 β -cells during chronic oxidative stress and glucose toxicity // J. Endocr. Soc. – 2023. – V. 7(3). – P. 1-5.

12. Adams P.C., Deugnier Y., Moirand R., Brissot P. The relationship between iron overload, clinical symptoms and age in 410 patients with genetic hemochromatosis // *Hepatology*. – 1997. – V. 25. – P. 162-166.
13. Aisen P., Leibman A., Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin // *J. Biol. Chem.* – 1978. – V. 253(6). – P. 1930-1937.
14. Aisen P. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells // *Met. Ions. Biol. Syst.* - 1998. - V. 35. - P. 585-631.
15. Ajioka R.S., Phillips J.D., Kushner J.P. Biosynthesis of heme in mammals // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1763(7). – P. 723-736.
16. Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi M.R., Jamshidi Sh., Farhangi A., Verdi A.A., Mofidian S.M., Rad B.L. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2007. – V. 22(2). – P. 60-64.
17. Akter S., Nanri A., Kuwahara K., Matsushita Y., Nakagawa T., Konishi M., Honda T., Yamamoto S., Hayashi T., Noda M., Mizoue T. Circulating ferritin concentrations and risk of type 2 diabetes in Japanese individuals // *J. Diabetes Investig.* – 2017. – V. 8(4). – P. 462-470.
18. Alfadhel M., Babiker A. Inborn errors of metabolism associated with hyperglycaemic ketoacidosis and diabetes mellitus: narrative review // *Sudan J. Paediatr.* – 2018. – V. 18(1). – P. 10-23.
19. American Diabetes Association Classification and Diagnosis of Diabetes: standards of medical care in diabetes-2021 // *Diabetes Care.* – 2021. – V. 44(Suppl 1). – P. S15-S33.
20. Almind K., Bjorbaek C., Vestergaard H., Hansen T., Echwald S., Pedersen O. Amino acid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Lancet.* - 1993. - V. 342. - P. 828–832.
21. Al-Sulaiti H., Diboun I., Agha M. V., Mohamed F. F. S., Atkin S., Dömling A. S., Mohamed E. A., Mazloum N. A. Metabolic signature of obesity-associated insulin resistance and type 2 diabetes // *J. Transl. Med.* – 2019. – V. 17(1). – P. 348.
22. Anderson G.J., Frazer D.M., McKie A.T., Vulpe C.D. The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2002. – V. 29. – P. 367-375.
23. Andriopoulos B., Jr., Corradini E., Xia Y., Faasse S.A., Chen S., Grgurevic L., Knutson M.D., Pietrangelo A., Vukicevic S., Lin H.Y., Babitt J.L. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism // *Nat. Genet.* – 2009. – V. 41. – P. 482–487.

24. Araki N., Higashi T., Mori T., Shibayama R., Kawabe Y., Kodama T., Takahashi K., Shichiri M., Horiuchi S. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 230(2). – P. 408-415.
25. Armbruster D.A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness // *Clin. Chem.* – 1987. – V. 33. – P. 2153-2163.
26. Atari-Hajipirloo S., Valizadeh N., Khadem-Ansari M.H., Rasmi Y., Kheradmand F.. Altered concentrations of copper, zinc, and iron are associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with type 2 diabetes mellitus and their first-degree relatives // *Int. J. Endocrinol. Metab.* – 2016. – V. 14(2). – P. e33273.
27. Aziz U. R. A., Farid S., Qin K., Wang H., Liu B. Regulation of insulin resistance and glucose metabolism by interaction of PIM kinases and insulin receptor substrates // *Arch. Physiol. Biochem.* – 2020. – V. 126(2). – P. 129-138.
28. Babitt J.L., Huang F.W., Wrighting D.M., Xia Y., Sidis Y. Samad T.A., Campagna J.A., Chung R.T., Schneyer A.L., Woolf C.J., Andrews N.C., Lin H.Y. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression // *Nat. Genet.* – 2006. – V. 38. – P. 531–539.
29. Baker E., Shaw D.C., Morgan E.H. Isolation and characterization of rabbit serum and milk transferrins. Evidence for difference in sialic acid content only // *Biochemistry.* – 1968. – V. 7(4). – P. 1371-1378.
30. Baker H.M., Baker E.N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – V. 62. – P. 2531-2539.
31. Bakker G.R., Boyer R.F. Iron incorporation into apoferritin. The role of apoferritin as a ferroxidase // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261(28). – P. 13182–13185.
32. Baldwin D.A., Jenny E.R., Aisen P. The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* – 1984. – V. 259. – P. 13391-13394.
33. Bali P.K., Aisen P. Receptor-modulated iron release from transferrin: differential effects on the N- and C-terminal sites // *Biochemistry.* - 1991. - V. 30. - P. 9947–9952.
34. Bannister J.V., Bannister W.H., Hill A.O., Mahood J.F., Willson R.L. and Wolfenden B.S. Does caeruloplasmin dismutate superoxide? No // *FEBS Lett.* – 1980. – V. 188. – P. 127-129.
35. Barnes N., Tsivkovskii R., Tsivkovskaia N., Lutsenko S. The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280(10). – P. 9640-9645.

36. Basaki M., Saeb M., Nazifi S., Shamsaei H.A. Zinc, copper, iron, and chromium concentrations in young patients with type 2 diabetes mellitus // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 2012. – V. 148(2). – P. 161–164.

37. Baynes R., Bezwoda W., Bothwell T., Khan Q., Mansoor N. The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1986. – V. 46(7). – P.695-704.

38. Bennett M.J., Lebrón J.A., Bjorkman P.J.. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor // *Nature.* – 2000. – V. 403(6765). – P.46-53.

39. Bento I., Peixoto C., Zaitsev V.N., Lindley P.F. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. // *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2007. – V. 63. – P. 240-248.

40. Bierhaus A., Schiekofer S., Schwaninger M., Andrassy M., Humpert P.M., Chen J., Hong M., Luther T., Henle T., Klötting I., Morcos M., Hofmann M., Tritschler H. Weigle B., Kasper M., Smith M., Perry G., Schmidt A.M., Stern D.M., Häring H.U., Schleicher E., Nawroth P.P. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB // *Diabetes.* – 2001. – V. 50. – P. 2792-2808.

41. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM // *Diabetes.* – 1997. – V. 46(1). – P. 3-10.

42. Botusan I.R., Sunkari V.G., Savu O., Catrina A.I., Grünler J., Lindberg S., Pereira T., Ylä-Herttuala S., Poellinger L., Brismar K., Catrina S.B. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105(49). – P. 19426-19431.

43. Boucher J., Kleinridders A., Kahn C.R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2014. – V. 6(1). – P. a009191.

44. Brings S., Fleming T., Freichel M., Muckenthaler M.U., Herzig S., Nawroth P.P. Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18(5). – P. 984.

45. Brissot P., Bardou-Jacquet E., Jouanolle A.M., Loréal O. Iron disorders of genetic origin: a changing world // *Trends Mol. Med.* – 2011. – V. 17(12). – P. 707-713.

46. Brissot P., Wright T.L., Ma W.L., Weisiger R.A. Efficient clearance of non-transferrin-bound iron by rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states // *J. Clin. Invest.* – 1985. – V. 76(4). – P. 1463-1470.

47. Brown M.A., Stenberg L.M., Grant Mauk A. Identification of catalytically important amino acids in human ceruloplasmin by site-directed mutagenesis // *FEBS Lett.* – 2002. – V. 520. – P. 8-12.
48. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // *Nature.* – 2001. – V. 414(6865). – P. 813-20.
49. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism // *Diabetes.* – 2005. – V. 54. – P. 1615-1625.
50. Bruni A., Pepper A. R., Pawlick R. L., Lopez B.-G., Gamble A. F., Kin T., Seeberger K., Korbitt G. S., Bornstein S. R., Linkermann A., Shapiro A. M. J. Ferroptosis-inducing agents compromise in vitro human islet viability and function // *Cell. Death. Dis.* – 2018. – V. 9(6). – P. 595.
51. Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M., Forbes J.R., Cox D.W. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene // *Nat. Genet.* – 1993. – V. 5(4). – P. 327-337.
52. Bunt J.C., Krakoff J., Ortega E., Knowler W.C., Bogardus C. Acute insulin response is an independent predictor of type 2 diabetes mellitus in individuals with both normal fasting and 2-h plasma glucose concentrations // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2007. – V. 23(4). – P. 304-310.
53. Cabantchik I. Z., Hershko C. Plasma nontransferrin bound iron-nontransferrin bound iron revisited: Implications for systemic iron overload and in iv iron supplementation // *Am. J. Hematol.* – 2022. – V. 97(1). – P. 7-9.
54. Calzolari A., Raggi C, Deaglio S., Sposi N.M, Stafnes M., Fecchi K., Parolini I., Malavasi F., Peschle C., Sargiacomo M., Testa U. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway // *J. Cell Sci.* – 2006. – V. 119(Pt 21). – P. 4486–4498.
55. Camagni G. F., Minervini G., Tosatto S. C. E. Structural characterization of hypoxia inducible factor α -prolyl hydroxylase domain 2 interaction through MD simulation // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24(5). – P. 4710.
56. Campos-Escamilla C., Siliqi D., Gonzalez-Ramirez L. A., Lopez-Sanchez C., Gavira J. A., Moreno A. X-ray Characterization of Conformational Changes of Human Apo- and Holo-Transferrin // *In. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22(24). – P. 13392.
57. Canali¹ S., Core A.B., Zumbrennen-Bullough K.B., Merkulova M., Wang C.Y., Schneyer A.L., Pietrangelo A., Babitt J.L. Activin b induces noncanonical Smad1/5/8 signaling via BMP type I receptors in hepatocytes: evidence for a role in hepcidin induction by inflammation in male mice // *Endocrinology.* – 2016. – V. 157(3). – P. 1146–1162.

58. Canali² S., Vecchi C., Garuti C., Montosi G., Babitt J.L., Pietrangelo A. The SMAD pathway is required for hepcidin response during endoplasmic reticulum stress // *Endocrinology*. – 2016. – V. 157(10). – P. 3935–3945.
59. Canonne-Hergaux F., Gruenheid S., Govoni G., Gros P. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function // *Proc. Assoc. Am. Physicians*. – 1999. – V. 111(4). – P. 283-289.
60. Chasteen N.D. Ferritin. Uptake, storage, and release of iron // *Met. Ions Biol. Syst.* – 1998. – V. 35. – P. 479-514.
61. Casanovas G., Mleczko-Sanecka K., Altamura S., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD // *J. Mol. Med.* – 2009. – V. 87. – P. 471–480.
62. Casey J.L., Hentze M.W., Koeller D.M., Caughman S.W., Rouault T.A., Klausner R.D., Harford J.B. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation // *Science*. – 1988. – V. 240(4854). – P. 924-928.
63. Catrina S.-B., Okamoto K., Pereira T., Brismar K., Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function // *Diabetes*. – 2004. – V. 53(12). – P. 3226-3232.
64. Catrina S.-B., Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications // *Diabetologia*. – 2021. – V. 64(4). – P. 709–716.
65. Cazzola M., Invernizzi R., Bergamaschi G., Levi S., Corsi B., Travaglino E., Rolandi V., Biasiotto G., Drysdale J., Arosio P. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia // *Blood*. – 2003. – V. 101(5). – P. 1996-2000.
66. Cegarra L., Colins A., Gerdtzen Z. P., Nuñez M. T., Salgado J. C. Mathematical modeling of the relocation of the divalent metal transporter DMT1 in the intestinal iron absorption process // *PLoS. One*. – 2019. – V. 14(6). – E0218123.
67. Cen Y., Wang P., Gao F., Jing M., Zhang Z., Yi P., Zhang G., Sun Y., Wang Y. Tetramethylpyrazine nitro compound activates hypoxia-inducible factor and regulates iron homeostasis to improve renal anemia // *Front. Pharmacol.* – 2022. – V. 13. – P. 964234.
68. Chan C.B., De Leo D., Joseph J.W., McQuaid T.S., Ha X.F., Xu F., Tsushima R.G., Pennefather P.S., Salapatek A.M., Wheeler M.B. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action // *Diabetes*. – 2001. – V. 50(6). – P. 1302-1310.

69. Chaudhary J., Skinner M.K. Comparative sequence analysis of the mouse and human transferrin promoters: hormonal regulation of the transferrin promoter in Sertoli cells // *Mol. Reprod. Dev.* – 1998. – V. 50(3). – P. 273-283.

70. Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V., Mercurio S., Tolosan E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes // *Front. Pharmacol.* – 2014. - V. 5 – Article 61.

71. Che W., Asahi M, Takahashi M, Kaneto H, Okado A, Higashiyama S, Taniguchi N. Selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in rat aortic smooth muscle cells. The involvement of reactive oxygen species formation and a possible implication for atherogenesis in diabetes // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272(29). – P. 18453-18459.

72. Chen H., Attieh Z.K., Syed B.A., Kuo Y.M., Stevens V., Fuqua B.K., Andersen H.S., Naylor C.E., Evans R.W., Gambling L., Danzeisen R., Bacouri-Haidar M., Usta J., Vulpe C.D., McArdle H.J. Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopper ferroxidase family, and characterization in rodents and human cells // *J. Nutr.* – 2010. – V. 140(10). – P. 1728-1735.

73. Chen H., Su T., Attieh Z.K., Fox T.C., McKie A.T., Anderson G.J., Vulpe C.D. Systemic regulation of Hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency // *Blood* – 2003. – V. 102. – P. 1893-1899.

74. Chen J., Chloupková M., Gao J., Chapman-Arvedson T.L., Enns C.A. HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282(51). – P. 36862-36870.

75. Chen L., Li Y., Zhang F., Zhang S., Zhou X., Ji L. Elevated serum ferritin concentration is associated with incident type 2 diabetes mellitus in a Chinese population: A prospective cohort study // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2018. – V. 139. – P. 155-162.

76. Chen T.T., Li L., Chung D.H., Allen C.D., Torti S.V., Torti F.M., Cyster J.G., Chen C.Y., Brodsky F.M., Niemi E.C., Nakamura M.C., Seaman W.E., Daws M.R. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 202(7). – P. 955-965.

77. Chen W., Dailey H.A., Paw B.H. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis // *Blood.* – 2010. – V. 116(4). – P. 628-630.

78. Chen Y.D., Golay A., Swislocki A.L., Reaven G.M. Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose

uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus // *J. Clin. Endocrinol Metab.* – 1987. – V. 64(1). – P. 17-21.

79. Cheng, J. B., Wang, J. Q., Bu, D. P., Liu, G. L., Zhang, C. G., Wei, H. Y Zhou L. Y., Wang J. Z. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk // *J. Dairy Sci.* – 2008. – V. 91(3). – P. 970—976.

80. Cheung C.L., Cheung T.T., Lam K.S., Cheung B.M. High ferritin and low transferrin saturation are associated with pre-diabetes among a national representative sample of U.S. adults // *Clin. Nutr.* – 2013. – V. 32(6). – P. 1055-1060.

81. Choi H.-E., Kim D. Y., Choi M. J., Kim J. I., Kim O.-H., Lee J., Seo E., Cheon H. G. Tranilast protects pancreatic β -cells from palmitic acid-induced lipotoxicity via FoxO-1 inhibition // *Sci. Rep.* – 2023. – V. 13(1). – P. 101.

82. Cohrs C. M., Panzer J. K., Drotar D. M., Enos S. J., Kipke N., Chen C., Bozsak R., Schöniger E., Eehalt F., Distler M., Brennand A., Bornstein St. R., Weitz J., Solimena M., Speier S. Dysfunction of persisting β cells is a key feature of early type 2 diabetes pathogenesis // *Cell. Rep.* – 2020. – V. 31(1). – P. 107469.

83. Cooksey R.C., Jones D., Gabrielsen S., Huang J., Simcox J.A., Luo B., Soesanto Y., Rienhoff H., Abel E.D., McClain D.A. Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep^{-/-}) mouse // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2010. – V. 298(6). – P. E1236-1243.

84. Cox N.J., Xiang K.S., Bell G.I., Karam J.H. Glucose transporter gene and non-insulin-dependent diabetes // *Lancet.* – 1988. – V. 2. – P. 794–793.

85. Craig E. T., Morehouse L. A., Aust S. D. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation // *J. Biol. Chem. Inc.* – 1985. – V. 260. - № 6. – P. 3275-3280.

86. Craven C.M., Alexander J., Eldridge M., Kushner J.P., Bernstein S., Kaplan J. Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – V. 84(10). – P. 3457-3461.

87. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C.B. Selective enzyme purification by affinity chromatography // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1968. – V. 61(2). – P. 636-643.

88. Cusick M., Meleth A.D., Agrón E., Fisher M.R., Reed G.F., Knatterud G.L., Barton F.B., Davis M.D., Ferris F.L. 3rd, Chew E.Y. Associations of mortality and diabetes complications in patients with type 1 and type 2 diabetes: early treatment diabetic retinopathy study report no. 27 // *Diabetes Care.* – 2005. – V. 28(3). – P. 617-625.

89. D'Alessio F., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation // *J. Hepatol.* – 2012. – V. 57(5). – P. 1052-1060.
90. Dandekar T., Stripecke R., Gray N.K., Goossen B., Constable A., Johansson H.E., Hentze M.W. Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid delta-aminolevulinic acid synthase mRNA // *EMBO J.* – 1991. – V. 10(7). – P. 1903-1909.
91. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes // *Trends. Immunol.* – 2004. – V. 25(1). – P. 4-7.
92. Dautry-Varsat A., Ciechanover A., Lodish H.F. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1983. – V. 80. – P. 2258–2262.
93. Davis B.J. Disk Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1964. - V. 121. - P. 404-427.
94. Davis R.J., Corvera S., Czech M.P. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261(19). – P. 8708-8711.
95. De Bie P., Muller P., Wijmenga C., Klomp L.W. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes // *J. Med. Genet.* – 2007. – V. 44(11). – P. 673–688.
96. De Domenico I., Ward D.M., Di Patti M.C., Jeong S.Y., David S., Musci G., Kaplan J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – P. 2823–2831.
97. DeFronzo R.A., Gunnarsson R., Björkman O., Olsson M., Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus // *J. Clin. Invest.* – 1985. – V. 76(1). – P. 149–155.
98. DeFronzo R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes // *Diabetes Rev.* – 1997. – V. 5. – P. 177–269.
99. DeFronzo R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // *Med. Clin. North. Am.* – 2004. – V. 88(4). – P. 787-835.
100. Deguchi H., Ikeda M., Ide T., Tadokoro T., Ikeda S., Okabe K., Ishikita A., Saku K., Matsushima S., Tsutsui H. Roxadustat markedly reduces myocardial ischemia reperfusion injury in mice // *Circ. J.* – 2020. – V. 84(6). – P. 1028-1033.

101. DePirro R., Fusco A., Lauro R., Testa I., Ferreti F., DeMartinis C. Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Diabetes*. - 1980. - V. 29. - P. 96-99.
102. Diamon M., Yamatani K., Igarashi M., Fukase, N., Kawanami T. Fine structure of human ceruloplasmin gene // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – V. 208. – P. 1028-1035.
103. Dixon S. J., Lemberg K. M., Lamprecht M. R., Skouta R., Zaitsev E. M., Gleason C. E., Patel D. N., Bauer A. J., Cantley A. M., Yang W. S., Morrison B. 3rd, Stockwell B. R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death // *Cell*. – 2012. – V. 149(5). – P. 1060-10672.
104. Dodd M. S., Luz Sousa Fialho M., Montes A. C. N., Kerr M., Timm K. N., Griffin J. L., Luiken J. J. F. P., Glatz J. F., Tyler D. J., Heather L. C. Fatty acids prevent hypoxia-inducible factor-1 α signaling through decreased succinate in diabetes // *JACC. Basic. Transl. Sci.* – 2018. – V. 3(4). – P. 485-498.
105. Donovan A., Lima C.A., Pinkus J.L., Pinkus G.S., Zon L.I., Robine S., Andrews N.C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis // *Cell Metab.* – 2005. – V. 1. – P. 191–200.
106. Dorenkamp M., Nasiry M., Semo D., Koch S., Löffler I., Wolf G., Reinecke H., Godfrey R. Pharmacological targeting of the RAGE-NF κ B signalling axis impedes monocyte activation under diabetic conditions through the repression of SHP-2 tyrosine phosphatase function // *Cells*. – 2023. – V. 12(3). – P. 513.
107. Doorn J.A., Petersen D.R. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal // *Chem. Res. Toxicol.* – 2002. – V. 15(11). – P. 1445-1450.
108. Dresner A., Laurent D., Marcucci M., Griffin M.E., Dufour S., Cline G.W., Slezak L.A., Andersen D.K., Hundal R.S., Rothman D.L., Petersen K.F., Shulman G.I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity // *J. Clin. Invest.* – 1999. – V. 103(2). – P.253-259.
109. Du J., Wang T., Li Y., Zhou Y., Wang X., Yu X., Ren X., An Y., Wu Y., Sun W., Fan W., Zhu Q., Wang Y., Tong X. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2019. – V. 131. – P. 356-369.
110. Du X., She E., Gelbart T., Truksa J., Lee P., Xia Y., Khovananth K., Mudd S., Mann N., Moresco E.M., Beutler E., Beutler B. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency // *Science*. – 2008. – V. 320(5879). – P. 1088-1092.

111. Duscher D., Januszyk M., Maan Z. N., Whittam A. J., Hu M. S., Walmsley G. G., Dong Y., Khong S. M., Longaker M. T., Gurtner G. C. Comparison of the hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine and the iron chelator deferoxamine in diabetic and aged wound healing // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2017. – V. 139(3). – P. 695e-706e.
112. Dutra F., Ciriolo M.R., Calabrese L., Bechara E.J. Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin // *Chem. Res. Toxicol.* – 2005. – V. 18. – P. 755-760.
113. Düvel K., Yecies J. L., Menon S., Raman P., Lipovsky A. I., Souza A. L., Triantafellow E., Ma Q., Gorski R., Cleaver S., Vander Heiden M. G., MacKeigan J. P., Finan P. M., Clish C. B., Murphy L. O., Manning B. D. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1 // *Mol. Cell.* – 2010. – V. 39(2). – P. 171-183.
114. Echtay K.S., Murphy M.P., Smith R.A., Talbot D.A., Brand M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277(49). – P. 47129-47135.
115. Eckenroth B.E., Steere A.N., Chasteen N.D., Everse S.J., Mason A.B. How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108(32). – P. 13089-13094.
116. Eid C., Hémadi M., Ha-Duong N.T., El Hage Chahine J.M. Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 840. – P. 1771-1781.
117. El Amrousy D., El-Afify D., Elsayy A., Elsheikh M., Donia A., Nassar M. Lactoferrin for iron-deficiency anemia in children with inflammatory bowel disease: a clinical trial // *Pediatr. Res.* – 2022. – V. 92(3). – P. 762-766.
118. El-Zebda G. Significance of serum levels of copper and zinc in Type II diabetic, hypertensive, and diabetic hypertensive patients in Gaza City : Submitted in partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Biological sciences Medical Technology Faculty of Science. – The Islamic University-Gaza. – 2006.
119. Ellervik C., Mandrup-Poulsen T., Andersen H.U., Tybjærg-Hansen A., Frandsen M., Birgens H., Nordestgaard B.G. Elevated transferrin saturation and risk of diabetes: three population-based studies // *Diabetes Care.* – 2011. – V. 34(10). – P. 2256-2258.
120. Elvenjem C. A. The relative value of inorganic and organic iron in hemoglobin formation // *J. Am. Med. Ass.* – 1932. – V. 98(13). – P. 1047-1050.

121. Espinosa de los Monteros A., Sawaya B.E., Guillou F., Zakin M.M., de Vellis J., Schaeffer E. Brain-specific expression of the human transferrin gene. Similar elements govern transcription in oligodendrocytes and in a neuronal cell line // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269(39). – P. 24504-24510.
122. Fang X., Wang H., Han D., Xie E., Yang X., Wei J., Gu S., Gao F., Zhu N., Yin X., Cheng Q., Zhang P., Dai W., Chen J., Yang F., Yang H.-T., Linkermann A., Gu W., Min J., Wang F. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2019. – V. 116(7). – P. 2672-2680.
123. Fathil M. A.M., Katas H. antibacterial, anti-biofilm and pro-migratory effects of double layered hydrogels packaged with lactoferrin-DsiRNA-silver nanoparticles for chronic wound therapy // *Pharmaceutics.* – 2023. – V. 15(3). – P. 991.
124. Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R.Jr, Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayna D.T., Risch N.J., Bacon B.R., Wolff R.K. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis // *Nature Genetics.* – 1996. – V. 13. – No. 4. – P. 399–408.
125. Fernández-Cao J. C., Arija V., Aranda N., Basora J., Diez-Espino J., Estruch R., Fitó M., Corella D., Salas-Salvadó J. Soluble transferrin receptor and risk of type 2 diabetes in the obese and nonobese // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2017. – V. 47(3). – P. 221-230.
126. Ferretti G., Bacchetti T., Marchionni C., Caldarelli L., Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity // *Acta Diabetologica.* - 2001. - V.38. - P.163-169.
127. Ferris C.D., Jaffrey S.R., Sawa A., Takahashi M., Brady S.D., Barrow R.K., Tysoe S.A., Wolosker H., Barañano D.E., Doré S., Poss K.D., Snyder S.H. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron // *Nat. Cell Biol.* – 1999. – V. 1. – P. 152–157.
128. Filibeli B. E., Çatli G., Ayrancı İ., Manyas H., Kirbiyik Ö., DüNDAR B. Childhood-onset mild diabetes caused by a homozygous novel variant in the glucokinase gene // *Hormones. (Athens).* – 2022. – V. 21(1). – P. 163-169.
129. Fishbane S., Mathew A., Vaziri N.D. Iron toxicity: relevance for dialysis patients // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2014. – V. 29(2). – P. 255-259.
130. Fisher A. L., Wang C.-Y., Xu Y., Joachim K., Xiao X., Phillips S., Moschetta G. A., Alfaro-Magallanes V. M., Babitt J. L. Functional role of endothelial

transferrin receptor 1 in iron sensing and homeostasis // *Am. J. Hematol.* – 2022. – V. 97(12). – P. 1548-1559.

131. Fleming R.E. Hepcidin activation during inflammation: make it STAT // *Gastroenterology.* – 2007. – V. 132. – P. 447–449.

132. Frieden E., Hsieh H.S. Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity // *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* – 1976. - V. 44. - P. 187-236.

133. Fu Z., Gilbert E.R., Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes // *Curr. Diabetes Rev.* – 2013. – V. 9(1). – P. 25–53.

134. Fujimoto S., Kawakami N., Ohara A. Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production // *Biol. Pharm. Bull.* – 1995. – V. 18(3). – P. 396-400.

135. Fujisawa T., Ikegami H., Yamato E., Takekawa K., Nakagawa Y., Hamada Y., Ueda H., Fukuda M., Ogihara T. A mutation in the glucagon receptor gene (Gly40Ser): heterogeneity in the association with diabetes mellitus // *Diabetologia.* – 1995. – V. 38(8). – P. 983-985.

136. Fumeron F., Péan F., Driss F., Balkau B., Tichet J., Marre M., Grandchamp B. Insulin resistance syndrome (DESIR) study group. ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years: the data from an epidemiological study on the insulin resistance syndrome (DESIR) study // *Diabetes Care.* – 2006. – V. 29(9) – P. 2090-2094.

137. Furuyama K., Kaneko K., Vargas P.D. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2007. – V. 213. – P. 1–16.

138. Gaasch J.A., Geldenhuys W.J., Lockman P.R., Allen D.D., Van der Schyf C.J. Voltage-gated calcium channels provide an alternate route for iron uptake in neuronal cell cultures // *Neurochem. Res.* – 2007. – V. 32. – P. 1686–1693.

139. Gaastra W. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) // *Methods Mol. Biol.* – 1984. – V. 1. – P. 349-355.

140. Gabrielsen J.S., Gao Y., Simcox J.A., Huang J., Thorup D., Jones D., Cooksey R.C., Gabrielsen D., Adams T.D., Hunt S.C., Hopkins P.N., Cefalu W.T., McClain D.A. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity // *J. Clin. Invest.* – 2012. – V. 122(10). – P. 3529–3540.

141. Gao Y., Xie Z., Ho C., Wang J., Li Q., Zhang Y., Zhou J. LRG1 promotes keratinocyte migration and wound repair through regulation of HIF-1 α stability // *J. Invest. Dermatol.* – 2020. – V. 140(2). – P. 455-464.e8.
142. Garza K. R., Clarke S. L., Ho Y.-H., Bruss M. D., Vasanthakumar A., Anderson S. A., Eisenstein R. S. Differential translational control of 5' IRE-containing mRNA in response to dietary iron deficiency and acute iron overload // *Metallomics.* – 2020. – V. 12(12). – P. 2186-2198.
143. Gaur K., Pérez Otero S. C., Benjamín-Rivera J. A., Rodríguez I., Loza-Rosas S. A., Vázquez Salgado A. M., Akam E. A., Hernández-Matias L., Sharma R. K., Alicea N., Kowaleff M., Washington A. V., Astashkin A. V., Tomat E., Tinoc A. D. Iron chelator transmetalative approach to inhibit human ribonucleotide reductase // *JACS Au.* – 2021. – V. 1(6). – P. 865-878.
144. Gaschler M. M., Andia A. A., Liu H., Csuka J. M., Hurlocker B., Vaiana C. A., Heindel D. W., Zuckerman D. S., Bos P. H., Reznik E., Ye L. F., Tyurina Y. Y., Lin A. J., Shchepinov M. S., Chan A. Y., Peguero-Pereira E., Fomich M. A., Daniels J. D., Bekish A.V., Shmanai V. V., Kagan V. E., Mahal L. K., Woerpel K. A., Stockwell B. R. FINO2 initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – V. 14(5). – P. 507-515.
145. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – V. 482(3). – P. 419–425.
146. Gao J., Chen J., Kramer M., Tsukamoto H., Zhang A.S., Enns C.A. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression // *Cell Metab.* – 2009. – V. 9. – P. 217–227.
147. Garvey W.T., Huecksteadt T.P., Matthaei S., Olefsky J.M. Role of glucose transporters in the cellular insulin resistance of type II non-insulin-dependent diabetes mellitus // *J. Clin. Invest.* – 1988. – V. 81(5). – P. 1528-1536.
148. Gęgotek A., Skrzydlewska E. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products // *Chem. Phys. Lipids.* – 2019. – V. 221. – P. 46-52.
149. Gelb M.H., Harris D.C. Correlation of proton release and ultraviolet difference spectra associated with metal binding by transferrin // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1980. – V. 200. – P. 93–98.
150. Ghiselli A., Laurenti, O., De Mattia G., Maiani G., Ferro-Luzzi A. Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients // *Free Radic. Biol. Med.* – 1992. – V. 13. – P. 621–626.

151. Ghosh S., Sinha S., Shivakumar N., Thomas T., Singh Sachdev H., Kurpad A.V. Daily Iron Requirements in Healthy Indian Children and Adolescents // *Indian Pediatr.* – 2019. – V. 56(7). – P. 551-555.
152. Gitlin J.D. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V. 263(13). – P. 6281-6287.
153. Golizeh M., Lee K1, Ilchenko S., Ösme A., Bena J., Sadygov R.G., Kashyap S.R., Kasumov T. Increased serotransferrin and ceruloplasmin turnover in diet-controlled patients with type 2 diabetes // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 113. – P. 461-469.
154. Gomme P.T., McCann K.B., Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions // *Drug. Discov.* – 2005. – V. 10(4). – P. 267–273.
155. Goodarzi M.T., Rashidi M., Rezaei M. Study of nonenzymatic glycation of transferrin and its effect on iron-binding antioxidant capacity // *Iran J. Basic Med. Sci.* – 2010. – V. 13. – № 4. – P. 194-199.
156. Goswami T., Andrews N.C. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281(39). – P. 28494-28498.
157. Gunshin H., Fujiwara Y., Custodio A.O., Drenth C., Robine S., Andrews N.C. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver // *J. Clin. Invest.* – 2005. – V. 115. – P. 1258–1266.
158. Gunshin H., MacKenzie B., Berger V.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L., Hediger M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton coupled metal ion transporter // *Nature.* – 1997. – V. 389. – P. 482-488.
159. Guo B., Yu Y., Leibold E.A. Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269(39). – P. 24252-24260.
160. Gurgul-Convey E., Mehmeti I., Plötz T., Jörns A., Lenzen S. Sensitivity profile of the human EndoC- β H1 beta cell line to proinflammatory cytokines // *Diabetologia.* – 2016. – V. 59(10). – P. 2125-2133.
161. Gupta S., Jain U., Chauhan N. Laboratory diagnosis of HbA1c: a review // *J. Nanomed. Res.* – 2017. V. 5(4). – P. 00120.
162. Gutteridge J.M. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides // *FEBS Lett.* – 1986. – V. 201(2). – P. 291-295.

163. Habig W. H., Pabst M. J., Fleischner G., Gatmaitan Z., Arias I. M., Jakoby W. B. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1974. – V. 71(10). – P. 3879-3882.
164. Hagel L. Gel-filtration chromatography // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2001. - Chapter 10. - Unit 10.9.
165. Hall D.R., Hadden J.M., Leonard G.A., Bailey S., Neu M., Winn M., Lindley P.F. The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2002. – V. 58(Pt 1). – P. 70-80.
166. Harmon J.S., Stein R, Robertson R.P. Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280(12). – P. 11107-11113.
167. Ha-Duong N.T., Eid C., Hémadi M., El Hage Chahine J.M. In vitro interaction between ceruloplasmin and human serum transferrin // *Biochemistry.* – 2010. - V. 49(48). – P.10261-10263.
168. Hedge J.E., Rist C.E. The Amadori rearrangement under new conditions and its significance for non-enzymatic browning reactions // *J. Am. Chem. Soc.* – 1953. – V. 75. – P. 316-322.
169. Helander A., Kenan Modén N. Effect of transferrin glycation on the use of carbohydrate-deficient transferrin as an alcohol biomarker // *Alcohol Alcohol.* – 2013. – V. 48(4). – P. 478-482.
170. Hennige A.M., Burks D.J., Ozcan U., Kulkarni R.N., Ye J., Park S., Schubert M., Fisher T.L., Dow M.A., Leshan R., Zakaria M., Mossa-Basha M., White M.F. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β cells prevents diabetes // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V. 112(10). – P. 1521–1532.
171. Herd Z.L., Cebra J.J. Selection of a single antigenic type of rabbit light chains by the 2,4-dinitrophenyl hapten // *Immunochemistry.* – 1970. – V. 7. – P. 7-13.
172. Hider R.C. Nature of nontransferrin-bound iron // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 32. (Suppl 1). – P. 50-54.
173. Hinman C.L., Green C.L., Denno D., Rauch H.C., Hudson R.A. Affinity chromatographic purification of antibody subsets depends on the mode of cross-linking of antigen to the affinity matrix // *Mol. Immunol.* – 1985. – V. 22(6). – P. 681-688.
174. Hiroshi M. U., Hiroshi U., Toshiya K. Serum albumin forms a lactoferrin-like soluble iron-binding complex in presence of hydrogen carbonate ions // *Food. Chem.* – 2014. – V. 145. – P. 90-94.

175. Hofmann S. M., Zhou L., Perez-Tilve D., Greer T., Erin Grant, Wancata L., Thomas A., Pfluger P. T., Basford J. E., Gilham D., Herz J., Tschöp M. H., Hui D. Y. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 17(11). – P. 3271-3282.
176. Holmquist W.E., Schroeder W.A. A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A1 // *Biochemistry.* – 1966. - V. 5. - P. 2489-2503.
177. Hu M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma // *Methods. Enzymol.* – 1994. – V. 233. – P. 380–385.
178. Hu P., Zhao F., Wang J., Zhu W. Lactoferrin attenuates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses and barrier impairment through the modulation of NF- κ B/MAPK/Nrf2 pathways in IPEC-J2 cells // *Food. Funct.* – 2020. – V. 11(10). – P. 8516-8526.
179. Huang X., Liu G., Guo J., Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes // *Int. J. Biol. Sci.* – 2018. – V. 14(11). – P. 1483–1496.
180. Hudson D.M., Curtis S.B., Smith V.C., Griffiths T.A., Wong A.Y., Scudamore C.H., Buchan A.M., MacGillivray R.T. Human hephaestin expression is not limited to enterocytes of the gastrointestinal tract but is also found in the antrum, the enteric nervous system, and pancreatic β -cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2010. – V. - 298(3). – P. G425-432.
181. Hudson D.M., Krisinger M.J., Griffiths T.A., Macgillivray R.T. Neither human hephaestin nor ceruloplasmin forms a stable complex with transferrin // *J. Cell Biochem.* – 2008. – V. 103(6). – P. 1849-1855.
182. Hultén L., Gramatkovski E., Glerup A., Hallberg L. Iron absorption from the whole diet. Relation to meal composition, iron requirements and iron stores // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 1995. – V. 49(11). – P. 794-808.
183. Hunter G.A., Al-Karadaghi S., Ferreira G.C. Ferrochelatase: the convergence of the porphyrin biosynthesis and iron transport pathways // *J. Porphyr. Phthalocyanines.* – 2011. – V. 15(5-6). – P. 350–356.
184. Hvidberg V., Maniecki M.B., Jacobsen C., Højrup P., Møller H.J., Moestrup S.K. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes // *Blood.* – 2005. – V. 106(7). – P. 2572-2579.
185. Idzerda R.L., Huebers H., Finch C.A., McKnight G.S. Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – V. 83(11). – P. 3723–3727.

186. Indyk D., Bronowicka-Szydełko A., Gamian A., Kuzancorresponding A. Advanced glycation end products and their receptors in serum of patients with type 2 diabetes // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – P. 13264.
187. Institute of medicine. Food and nutrition board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc: a report of the panel on micronutrientsexternal link disclaimer // Washington. DC: National Academy Press. – 2001.
188. Iwai K., Drake S.K., Wehr N.B., Weissman A.M., LaVaute T., Minato N., Klausner R.D., Levine RL., Rouault T.A. Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95(9). – P. 4924-4928.
189. Jan K., Nahmias C., Coates G., Hargreave F.E., Davis C., Dolovich J. The use of radioactive isotopes for analysis of cutaneous allergic responses // *Clin. Allergy.* – 1980. – V. 10(1). – P. 25-31.
190. Jan K.E., Schaeffer M., Silverberg J.I. Association between atopic disease and anemia in us children // *JAMA Pediatr.* – 2016. – V. 170(1). – P. 29-34.
191. Jeffrey P.D, Bewley M.C., MacGillivray R.T., Mason A.B., Woodworth R.C., Baker E.N. Ligand-induced conformational change in transferrins: crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37(40). – P. 13978-13986.
192. Jeng C.Y., Sheu W.H., Fuh M.M., Chen Y.D., Reaven G.M. Relationship between hepatic glucose production and fasting plasma glucose concentration in patients with NIDDM // *Diabetes.* – 1994. – V. 43(12). – P. 1440-1444.
193. Jeong S.Y., David S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278(29). – P. 27144-27148.
194. Jiang N., Zhao H., Han Y., Li L., Xiong S., Zeng L., Xiao Y., Wei L., Xiong X., Gao P., Yang M., Liu Y., Sun L. HIF-1 α ameliorates tubular injury in diabetic nephropathy via HO-1-mediated control of mitochondrial dynamics // *Cell. Prolif.* – 2020. – V. 53(11). – P. e12909.
195. Jiang R., Manson J.E., Meigs J.B., Ma J., Rifai N., Hu F.B. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women // *JAMA.* – 2004. – V. 291(6). – P. 711-717.

196. Johnson N.B., Deck K.M., Nizzi C.P., Eisenstein R.S. A synergistic role of IRP1 and FBXL5 proteins in coordinating iron metabolism during cell proliferation // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292(38). – P. 15976-15989.
197. Jordan J.B., Poppe L., Haniu M., Arvedson T., Syed R., Li V., Kohno H., Kim H., Schnier P.D., Harvey T.S., Miranda L.P., Cheetham J., Sasu B.J. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 24155–24167.
198. Jouini N., Saied Z., Ben Sassi S., Nebli F., Messaoud T., Hentati F., Belal S. Impacts of Iron Metabolism Dysregulation on Alzheimer's Disease // *J. Alzheimers Dis.* – 2021 – V. 80(4). – P. 1439-1450.
199. Juan S.H., Aust S.D. Studies on the interaction between ferritin and ceruloplasmin // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – V. 355. – P. 56-62.
200. Kadowaki H., Yasuda K., Iwamoto K., Otabe S., Shimokawa K., Silver K., Walston J., Yoshinaga H., Kosaka K., Yamada N., Saito Y., Hagura R., Akanuma Y., Shuldiner A., Yazaki Y., Kadowaki T. A mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – V. 215(2). – P. 555-560.
201. Kagan V., Mao G., Qu F., Friedmann Angeli J. P., Doll S., Croix C. S., Dar H. H., Liu B., Tyurin V. A., Ritov V. B., Kapralov A. A., Amoscato A. A., Jiang J., Anthonymuthu T., Mohammadyani D., Yang Q., Proneth B., Klein-Seetharaman J., Watkins S., Bahar I., Greenberger J., Mallampalli R. K., Stockwell B. R., Tyurina Y. Y, Conrad M., Bayır H. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis // *Nat. Chem. Biol.* – 2017. – V. 13(1). – P. 81-90.
202. Kahn S.E., Hull R.L, Utzschneider K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes // *Nature.* – 2006. – V. 444(7121). – P. 840-846.
203. Kajikawa M., Ohta T., Takase M., Kawase K., Shimamura S., Matsuda I. Lactoferrin inhibits cholesterol accumulation in macrophages mediated by acetylated or oxidized low-density lipoproteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1213(1). – P. 82-90.
204. Kanamori Y., Murakami M., Sugiyama M., Hashimoto O., Matsui T., Funaba M. Interleukin-1 β (IL-1 β) transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein δ (C/EBP δ) expression in hepatocytes // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292(24). – P. 10275-10287.

205. Kaneto H., Kimura T., Shimoda M., Obata A., Sanada J., Fushimi Y., Matsuoka T., Kaku K. Molecular Mechanism of Pancreatic β -Cell Failure in Type 2 Diabetes Mellitus // *Biomedicines*. – 2022. – V. 10(4). – P: 818.
206. Kang D.K., Jeong J., Drake S.K., Wehr N.B., Rouault T.A., Levine R.L. Iron regulatory protein 2 as iron sensor. Iron-dependent oxidative modification of cysteine // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278(17). – P. 14857-14864.
207. Kautz L., Besson-Fournier C, Meynard D, Latour C, Roth MP, Coppin H. Iron overload induces BMP6 expression in the liver but not in the duodenum // *Haematologica*. – 2011. – V. 96(2). – P. 199–203.
208. Kashiwagi A., Verso M.A., Andrews J., Vasquez B., Reaven G., Foley J.E. In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus // *J. Clin. Invest.* – 1983. – V. 72. – P. 1246–1254.
209. Kasumov T., Golizeh M., Kashyap S. Glycation and deamidation result in hdl dysfunction in patients with type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2018. – V. 67 (Supplement 1). – P. 330-OR.
210. Kato J., Kobune M., Ohkubo S., Fujikawa K., Tanaka M., Takimoto R., Takada K., Takahari D., Kawano Y., Kohgo Y., Niitsu Y. Iron/IRP-1-dependent regulation of mRNA expression for transferrin receptor, DMT1 and ferritin during human erythroid differentiation // *Exp. Hematol.* – 2007. – V. 35. – P. 879–887.
211. Kautz L., Meynard D., Monnier A., Darnaud V., Bouvet R., Wang R.H., Deng C., Vaulont S., Mosser J., Coppin H., Roth M.P. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver // *Blood*. – 2008. – V. 112. – P. 1503–1509.
212. Keel S.B., Doty R.T., Yang Z., Quigley J.G., Chen J., Knoblauch S., Kingsley P.D, De Domenico I., Vaughn M.B., Kaplan J., Palis J., Abkowitz J.L. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis // *Science*. – 2008. – V. 319. – P. 825–828.
213. Kelley D.E., Mintun M.A., Watkins S.C., Simoneau J.A., Jadali F., Fredrickson A., Beattie J., Thériault R. The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle // *J. Clin. Invest.* – 1996. – V. 97(12). – P. 2705-2713.
214. Kemna E.H., Tjalsma H., Willems H.L., Swinkels D.W. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis // *Haematologica*. – 2008. – V. 93. – P. 90-97.
215. Khan A.A., Quigley J.G. Heme and FLVCR-related transporter families SLC48 and SLC49 // *Mol. Aspects. Med.* – 2013. – V. 34(2-3). – P. 669–682.

216. Khan S.H., Manzoor R., Baig A. H., Tariq B., Ayub N., Sarwar S., Manzoor S. M., Fazal N., Nadeem A., Nadeem M., Niazi N. K. Role of HbA1c in diagnosis of gestational diabetes mellitus // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2020. – V. 70(10). – P. 1731-1736.
217. Kharroubi I., Ladrière L., Cardozo A.K., Dogusan Z., Cnop M., Eizirik D.L. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress // *Endocrinology.* – 2004. – V. 145(11). – P. 5087-5096.
218. Khorasani V., Jeddi S., Yaghmaei P., Tohidi M., Ghasemi A. Effect of long-term sodium nitrate administration on diabetes-induced anemia and glucose homeostasis in obese type 2 diabetic male rats // *Nitric Oxide.* – 2019. – V. 86. – P. 21-30.
219. Kikinis Z., Eisenstein R.S., Bettany A.J., Munro H.N. Role of RNA secondary structure of the iron-responsive element in translational regulation of ferritin synthesis // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – V. 23(20). – P.4190-4195.
220. Kim J. Y., van de Wall E., Laplante M., Azzara A., Trujillo M. E., Hofmann S. M., Schraw T., Durand J. L., Li H., Li G., Jelicks L. A., Mehler M. F., Hui D. Y., Deshaies Y., Shulman G. I., Schwartz G. J., Scherer P. E. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117(9). – P. 2621-2637.
221. Kim H.Y., LaVaute T., Iwai K., Klausner R.D., Rouault T.A. Identification of a conserved and functional iron-responsive element in the 5'-untranslated region of mammalian mitochondrial aconitase // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271(39). – P. 24226-24230.
222. Kim Joungmok 1, Mondira Kundu, Benoit Viollet, Kun-Liang Guan AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 // *Nat. Cell. Biol.* – 2011. – V. 13(2). – P. 132-141.
223. Kirsipuu T., Zadorožnaja A., Smirnova J., Friedemann M., Plitz T., Tougu V., Palumaa P. Copper(II)-binding equilibria in human blood. // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10. – 5686.
224. Kiss L., Szabó C. The pathogenesis of diabetic complications: the role of DNA injury and poly(ADP-ribose) polymerase activation in peroxynitrite-mediated cytotoxicity // *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* – 2005. – V. 100 (1). – P. 29-37.
225. Kiss X., Matsumura T., Edelstein D., Rossetti L., Zsengeller Z., Szabó C., Brownlee M. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V. 112. – P. 1049-1057.

226. Klein R.L., Laimins M., Lopes-Virella M.F. Isolation, characterization, and metabolism of the glycated and nonglycated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects // *Diabetes*. – 1995. – V. 44(9). – P. 1093-1098.
227. Klenk D.C., Hermanson G.T., Krohn R.I., Fujimoto E.K., Mallia A.K., Smith P.K., England J.D., Wiedmeyer H.M., Little R.R., Goldstein D.E. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences // *Clin. Chem.* – 1982. - V. 28. – P. 2088-2094.
228. Koch R.O., Zoller H., Theuri I., Obrist P., Egg G., Strohmayer W., Vogel W., Weiss G. Distribution of DMT 1 within the human glandular system // *Histol. Histopathol.* – 2003. – V. 18(4). – P. 1095–1101.
229. Kostevich V. A., Sokolov A. V., Kozlov S. O., Vlasenko A. Y., Kolmakov N. N., Zakharova E. T., Vasilyev V. B. Functional link between ferroxidase activity of ceruloplasmin and protective effect of apo-lactoferrin: studying rats kept on a silver chloride diet // *Biometals*. – 2016. – V. 29(4). – P. 691-704.
230. Kovačević M., Mališ S., Pavlović D., Kovačević M., Radojević A. S., Djukanović L. Plasma activity of the antioxidant enzymes in predicting diabetic nephropathy progression // *Int. Urol. Nephrol.* – 2022. – V. 54(6). – P. 1365-1372.
231. Kruszynska Y.T., Mulford M.I., Baloga J., Yu J.G., Olefsky J.M. Regulation of skeletal muscle hexokinase II by insulin in nondiabetic and NIDDM subjects // *Diabetes*. – 1998. – V. 47(7). – P. 1107-1113.
232. Kuo P.C., Kao C.H., Chen J.K. Glycated type 1 collagen induces endothelial dysfunction in culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2007. - V. 43. - P. 338-343.
233. Kurokawa H., Mikami B., Hirose M. Crystal structure of diferric hen ovotransferrin at 2.4 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 1995. – V. 254(2). – P. 196–207.
234. Lane D.J., Bae D.H., Merlot A.M., Sahni S., Richardson D.R. Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation // *Nutrients*. – 2015. – V. 7(4). – P. 2274-2296.
235. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophag // *Nature (London)*. – 1970. – V. 227. – P. 680-686.
236. Laurell C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies // *Anal. Biochem.* – 1966. – V. 15(1). – P. 45-52.

237. Lawan A., Bennett A.M. Mitogen-activated protein kinase regulation in hepatic metabolism // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2017. – V. 28. – P. 868–878.
238. Lawen A., Lane D.J. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – V. 18(18). – P. 2473-2507.
239. Lebrón¹ J.A., Bjorkman P.J. The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis // *J. Mol. Biol.* – 1999. – V. 289(4). – P. 1109-1118.
240. Lebrón² J.A., West A.P. Jr, Bjorkman P.J. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor // *J. Mol. Biol.* – 1999. – V. 294(1). – P. 239-245.
241. Lee A.Y., Chung S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract // *FASEB J.* – 1999. – V. 13(1). – P. 23-30.
242. Lee Duk-Hee 1, Ding Yong Liu, David R Jacobs Jr, Hai-Rim Shin, Kyungeun Song, In-Kyu Lee, Bowan Kim, Robert C Hider Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* – 2006. – V. 29(5). – P. 1090-1095.
243. Lee P., Peng H., Gelbart T., Wang L., Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2005. – V. 102. – P. 1906–1910.
244. Lee S., Liu T., Zhou J., Zhang Q., Wong W. T., Tse G. Predictions of diabetes complications and mortality using hba1c variability: a 10-year observational cohort study // *Acta. Diabetol.* – 2021. – V. 58(2). – P. 171-180.
245. Lee S., Dong H.H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism // *J. Endocrinol.* – 2017. – V. 233(2). – P. R67–R79.
246. Lepanto M. S., Rosa L., Cutone A., Conte M. P., Paesano R., Valenti P. Efficacy of lactoferrin oral administration in the treatment of anemia and anemia of inflammation in pregnant and non-pregnant women: an interventional study // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 2123.
247. Levi S., Yewdall S.J., Harrison P.M., Santambrogio P., Cozzi A., Rovida E., Albertini A., Arosio P. Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin // *Biochem. J.* – 1992. – V. 288(Pt 2). – P. 591–596.
248. Li J.Y., Paragas N., Ned R.M., Qiu A., Viltard M., Leete T., Drexler I.R., Chen X., Sanna-Cherchi S., Mohammed F., Williams D., Lin C.S., Schmidt-Ott K.M.,

Andrews N.C., Barasch J. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery // *Dev. Cell* – 2009. – V. 16. – P. 35–46.

249. Li X., Bao C., Zhao Y., Song H., Wang W. Statistical analysis on threshold of haemoglobin a1c (hba1c) for diabetes diagnosis and the relationship between hba1c and plasma glucose concentrations in chinese diabetic high-risk groups // *Clin. Lab.* – 2019. – V. 65(3).

250. Liang R., Liu N., Cao J., Liu T., Sun P., Cai X., Zhang L., Liu Y., Zou J., Wang L., Ding X., Zhang B., Shen Z., Yoshida S., Dou J., Wang S. HIF-1 α /FOXO1 axis regulated autophagy is protective for β cell survival under hypoxia in human islets // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* – 2022. - 1868(5). – P. 166356.

251. Lim J.E., Jin O., Bennett C., Morgan K., Wang F., Trenor C.C. 3rd, Fleming M.D., Andrews N.C. A mutation in Sec15l1 causes anemia in hemoglobin deficit (hbd) mice // *Nat. Genet.* – 2005. – V. 37(11). – P. 1270-1273.

252. Lim J., Park H. S., Kim J., Jang Y. J., Kim J.-H., Lee Y. J., Heo Y. Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers // *Int. J. Obes. (Lond).* – 2020. – V. 44(3). – P. 697-706.

253. Lin J.-D. Levels of the first-phase insulin secretion deficiency as a predictor for type 2 diabetes onset by using clinical-metabolic models // *Ann. Saudi. Med.* – 2015. – V. 35(2). – P. 138-45.

254. Lin Y., Berg A.H., Iyengar P., Lam T.K., Giacca A., Combs T.P., Rajala M.W., Du X., Rollman B., Li W., Hawkins M., Barzilai N., Rhodes C.J., Fantus I.G., Brownlee M., Scherer P.E. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280(6). – P. 4617-4626.

255. Lindley P.F., Card G., Zaitseva I., Zaitsev V., Reinhammar B., Selin-Lindgren E., Yosida K. An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity // *J. Biol. Inorg. Chem.* - 1997. - V. 2. - P. 454-463.

256. Liu C., Peng Q., Wei L., Li Z., Zhang X., Wu Y., Wang J., Zheng X., Wen Y., Zheng R., Yan Q., Ye Q., Ma J. Deficiency of Lactoferrin aggravates lipopolysaccharide-induced acute inflammation via recruitment macrophage in mice // *Biometals.* – 2022. – P. 1–14.

257. Liu L.-H. E., Gladwell Wesley, Christina T Teng Detection of exon polymorphisms in the human lactoferrin gene // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – V. 80(1). – P. 17-22.

258. Liu X.B., Yang F., Haile D.J. Functional consequences of ferroportin 1 mutations // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2005. – V. 35(1). – P. 33-46.
259. Liuzzi J.P., Aydemir F., Nam H., Knutson M.D., Cousins R.J. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – P. 13612–13617.
260. Loréal O., Cavey T., Bardou-Jacquet E., Guggenbuhl P., Ropert M., Brissot P. Iron, hepcidin, and the metal connection // *Front. Pharmacol.* – 2014. – V. 5. – P. 128.
261. Lowell B.B., Shulman G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes // *Science.* – 2005. – V. 307(5708). – P. 384–387.
262. Lu H., Lian L., Shi D., Zhao H., Dai Y. Hepcidin promotes osteogenic differentiation through the bone morphogenetic protein 2/small mothers against decapentaplegic and mitogen-activated protein kinase/P38 signaling pathways in mesenchymal stem cells // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – V. 11(1). – P. 143-50.
263. Ma Y., Zhou Q., Zhao P., Lu X., Gong C., Gao J., Liu J. Effect of transferrin glycation induced by high glucose on HK-2 cells in vitro // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2022. – V. 13. – P. 1009507.
264. MacDonald M.J., Cook J.D., Epstein M.L., Flowers C.H. Large amount of (apo)ferritin in the pancreatic insulin cell and its stimulation by glucose // *FASEB J.* – 1994. – V. 8(10). – P. 777-781.
265. MacGillivray R.T., Moore S.A., Chen J., Anderson B.F., Baker H., Luo Y., Bewley M., Smith C.A., Murphy M.E., Wang Y., Mason A.B., Woodworth R.C., Brayer G.D., Baker E.N. Two high-resolution crystal structures of the recombinant n-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37 (22). – P. 7919-7928.
266. McManus E. J., Sakamoto K., Armit L. J., Ronaldson L., Shpiro N., Marquez R., Alessi D. R. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis // *EMBO. J.* – 2005. – V. 24(8). – P. 1571–1583.
267. Maines M.D., Gibbs P.E. 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 338(1). – P. 568-577.
268. Makey D.G., Seal U.S. The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1976. – V. 453(1). – P. 250-256.

269. Malyszko J. Hemojuvelin: the hepcidin story continues // *Kidney Blood Press. Res.* – 2009. – V. 32(2). – P. 71-76.
270. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // *Immunochemistry.* – 1965. – V. 2(3). – P. 235-254.
271. Manning B. D., Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network // *Cell.* – 2017. – V. 169(3). – P. 381–405.
272. Mao Z., Liou S.-H., Khadka N., Jenney F. E. Jr, Goodin D. B., Seefeldt L. C., Adams M.W. W., Cramer S. P., Larsen D. S. Cluster-dependent charge-transfer dynamics in iron-sulfur proteins // *Biochemistry.* – 2018. – V. 57(6). – P. 978-990.
273. Marengo-Rowe A.J. Structure-function relations of human hemoglobins // *Proc. (Bayl. Univ.Med. Cent.).* – 2006. – V. 19(3). – P. 239–245.
274. Marques L., Auriac A., Willemetz A., Banha J., Silva B., Canonne-Hergaux F., Costa L. Immune cells and hepatocytes express glycoposphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2012. – V. 48. – P. 110-120.
275. Marshall S., Bacote V., Traxinger R.R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266(8). – P. 4706-4712.
276. Mason A.B., Byrne S.L., Everse S.J., Roberts S.E., Chasteen N.D., Smith V.C., MacGillivray R.T., Kandemir B., Bou-Abdallah F. A loop in the N-lobe of human serum transferrin is critical for binding to the transferrin receptor as revealed by mutagenesis, isothermal titration calorimetry, and epitope mapping // *J. Mol. Recognit.* – 2009. – V. 22(6). – P. 521-529.
277. Matias C., Devin W Belnap 1, Michael T Smith 1, Michael G Stewart 1, Isaac F Torres 1, Andrew J Gross 2, Richard K Watt 3 Citrate and albumin facilitate transferrin iron loading in the presence of phosphate // *J. Inorg. Biochem.* – 2017. – V. 168. – P. 107-113.
278. Mattei L., Francisqueti-Ferron F.V., Garcia J.L., Ferron A.J.T., de Almeida Silva C.C.V., Gregolin C.S., Nakandakare-Maia E.T., Silva J.D.C.P., Moreto F., Minatel I.O., Minatel I. O., Corrêa C. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of gamma-oryzanol attenuates insulin resistance by increasing GLUT-4 expression in skeletal muscle of obese animals // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2021. – V. 537. – P. 111423.

279. Matusiewicz M., Neubauer K., Lewandowska P., Gamian A., Krzystek-Korpacka M. Reduced transferrin levels in active inflammatory bowel disease // *Biomed. Res. Int.* – 2017. – V. 2017. – P. 9541370.
280. McClain D.A., Abraham D., Rogers J., Brady R., Gault P., Ajioka R., Kushner J.P. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis // *Diabetologia.* – 2006. – V. 49(7). – P. 1661-1669.
281. McKie A.T., Marciani P., Rolfs A., Brennan K., Wehr K., Barrow D., Miret S., Bomford A., Peters T.J., Farzaneh F., Hediger M.A., Hentze M.W., Simpson R.J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation // *Mol. Cell* – 2000. – V. 5. – P. 299–309.
282. McKnight G.S., Lee D.C., Palmiter R.D. Transferrin gene expression. Regulation of mRNA transcription in chick liver by steroid hormones and iron deficiency // *J. Biol. Chem.* – 1980. – V. 255(1). – P. 148-153.
283. Mendler M.H., Turlin B., Moirand R., Jouanolle A.M., Sapey T., Guyader D., Le Gall J.Y., Brissot P., David V., Deugnier Y. Insulin resistance-associated hepatic iron overload // *Gastroenterology.* – 1999. – V. 117(5). – P. 1155-1163.
284. Meynard D., Kautz L., Darnaud V., Canonne-Hergaux F., Coppin H., Roth M.P. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload // *Nat. Genet.* – 2009. – V. 41. – P. 478–481.
285. Miller D.M., Aust S.D. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1989. – V. 271(1). – P. 113-119.
286. Min Q. Q., Qin L. Q., Sun Z. Z., Zuo W.-T., Zhao L., Xu J.-Y. Effects of metformin combined with lactoferrin on lipid accumulation and metabolism in mice fed with high-fat diet // *Nutrients.* – 2018. – V. 10(11). – P. E1628.
287. Misra G., Bhattar S.K., Kumar A., Gupta V., Khan M.Y. Iron profile and glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus // *Med. Sci. (Basel).* – 2016. – V. 4(4). – P. E22.
288. Miyajima H., Takahashi Y., Kono S. Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism // *Biometals.* – 2003. – V. 16. – P. 205-213.
289. Miyajima H., Takahashi Y., Shimizu H., Sakai N., Kamata T., Kaneko E. Late onset diabetes mellitus in patients with hereditary aceruloplasminemia // *Intern. Med.* – 1996. – V. 35(8). – P. 641-645.

290. Mohamed W. A., Schaalán M. F. Antidiabetic efficacy of lactoferrin in type 2 diabetic pediatrics; controlling impact on PPAR- γ , SIRT-1, and TLR4 downstream signaling pathway // *Diabetol. Metab. Syndr.* – 2018. – V. 10. – P. 89.
291. Momeni A., Behradmanesh M.S., Kheiri S., Abasi F. Serum ferritin has correlation with HbA1c in type 2 diabetic patients // *Adv. Biomed. Res.* – 2015. – V. 4. – P. 74.
292. Monteiro D. G., Rishi G., Gorman D. M., Burnet G., Aliyanto R., Rosengren K. J., Frazer D. M., Subramaniam V. N., Clark R. J. Engineering peptide inhibitors of the HFE-transferrin receptor 1 complex // *Molecules.* – 2022. – V. 27(19). – E. 6581.
293. Moreno-Navarrete J. M., Serrano M., Sabater M., Ortega F., Serino M., Pueyo N., Luche E., Waget A., Rodriguez-Hermosa J. I., Ricart W., Burcelin R., Fernández-Real J. M. Study of lactoferrin gene expression in human and mouse adipose tissue, human preadipocytes and mouse 3T3-L1 fibroblasts. Association with adipogenic and inflammatory markers // *J. Nutr. Biochem.* – 2013. – V. 24(7). – P. 1266-1275.
294. Muckenthaler M. U., Galy B., Hentze M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network // *Annu. Rev. Nutr.* – 2008. – V. 28. – P. 197–213.
295. Mueckler M., Kruse M., Strube M., Riggs A.C., Chiu K.C., Permutt M.A. A mutation of the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 17765–17767.
296. Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Fox P.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency // *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - P. 21048-21054.
297. Mussa B. M., Srivastava A., Mohammed A. K., Verberne A. J. M. Nitric oxide interacts with cholinceptors to modulate insulin secretion by pancreatic β cells // *Pflugers. Arch.* – 2020. – V. 472(10). – P. 1469-1480.
298. Nakamura K., Kishida T., Ejima A., Tateyama R., Morishita S., Ono T., Murakoshi M., Sugiyama K., Nishino H., Mazda O. Bovine lactoferrin promotes energy expenditure via the cAMP-PKA signaling pathway in human reprogrammed brown adipocytes // *Biometals.* – 2018. – V. 31(3). – P. 415-424.
299. Nasteska D., Fine N. H. F., Ashford F. B., Cuzzo F., Vilorio K., Smith G., Dahir A., Dawson P. W. J., Lai Y.-C., Bastidas-Ponce A., Bakhti M., Rutter G. A., Fiancette R., Nano R., Piemonti L., Lickert H., Zhou Q., Akerman I., Hodson D. J.

PDX1^{LOW} MAFA^{LOW} β -cells contribute to islet function and insulin release // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – P. 674.

300. Nawrocki A.R., Rajala M.W., Tomas E., Pajvani U.B., Saha A.K, Trumbauer M.E., Pang Z., Chen A.S., Ruderman N.B., Chen H., Rossetti L., Scherer P.E. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281(5). – P. 2654-2660.

301. Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization // *Science.* – 2004. – V. 306. – P. 2090–2093.

302. Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan J.L., Bigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 110. – P. 1037-1044.

303. Niederau C., Berger M., Stremmel W., Starke A, Strohmeyer G., Ebert R., Siegel E., Creutzfeldt W. Hyperinsulinaemia in non-cirrhotic haemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation? // *Diabetologia.* – 1984. – V. 26(6). – P. 441-444.

304. Nishikawa¹ T., Edelstein D., Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications // *Kidney Int. Suppl.* – 2000. – V. 77. – P. 26-30.

305. Nishikawa² T., Edelstein D., Du X.L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M.A., Beebe D., Oates P.J., Hammes H.P., Giardino I., Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage // *Nature.* – 2000. – V. 404(6779). – P.787-790.

306. Ohgami R.S., Campagna D.R., Greer E.L., Antiochos B., McDonald A., Chen J., Sharp J.J., Fujiwara Y., Barker J.E., Fleming M.D. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells // *Nat. Genet.* - 2005. – V. 37. – P. 1264–1269.

307. Ohgami R.S., Campagna D.R., McDonald A., Fleming M.D. The Steap proteins are metalloreductases // *Blood.* – 2006. – V. 108. – P. 1388–1394.

308. Oliveira S.J, Pinto J.P., Picarote G., Costa V.M., Carvalho F., Rangel M., de Sousa M., de Almeida S.F. ER stress-inducible factor CHOP affects the expression of hepcidin by modulating C/EBPalpha activity // *PLoS. One.* – 2009. – V. 4(8). – P. 6618.

309. Ono T., Murakoshi M., Suzuki N., Iida N., Ohdera M., Iigo M., Yoshida T., Sugiyama K., Nishino H. Potent anti-obesity effect of enteric-coated latoferrin: decrease

in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets // *Br. J. Nutr.* – 2010. – V. 104(11). – P. 1688-1695.

310. Ortel T.L., Takahashi N., Putnam F.W. Structural model of human ceruloplasmin based on interal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and secondary structure of domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1984. – V. 81. – P. 4761-4765.

311. Osaki S. Kinetic studies of ferrous ion oxidation with crystalline human ferroxidase (ceruloplasmin) // *J. Biol. Chem.* – 1966. Vol. 241. – P. 5053–5059.

312. Osaki S., Johnson D.A., Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum // *J. Biol. Chem.* – 1966. – V. 241. – P. 2746-2751.

313. Oudit G.Y., Sun H., Trivieri M.G., Koch S.E., Dawood F., Ackerley C., Yazdanpanah M., Wilson G.J., Schwartz A., Liu P.P., Backx P.H. L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy // *Nat. Med.* – 2003. – V. 9. – P. 1187–1194.

314. Owen C.A., Smith H. Detection of ceruloplasmin after zone electrophoresis // *Clin. Chim. Acta.* – 1961. – V. 6. – P. 441-444.

315. Paesano R., Pacifici E., Benedetti S., Berlutti F., Frioni A., Polimeni A., Valenti P. 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.

316. Pandey R., Dingari N.C., Spegazzini N., Dasari R.R., Horowitz G.L., Barman I. Emerging trends in optical sensing of glycemic markers for diabetes monitoring // *Trends Analyt. Chem.* – 2015. – V. 64. – P. 100-108.

317. Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2004. – V. 1012. – P. 1-13.

318. Pak M., Lopez M.A., Gabayan V., Ganz T., Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity // *Blood.* – 2006. – V. 108. – P. 3730–3735.

319. Patel B.N., David S. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 20185-20190.

320. Patel B.N., Dunn R.J., David S. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, – P. 4305-4310.
321. Pedersen Morten Gram 1 2 3, Alessia Tagliavini 1, Jean-Claude Henquin 4 Calcium signaling and secretory granule pool dynamics underlie biphasic insulin secretion and its amplification by glucose: experiments and modeling // *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019 Mar 1;316(3):E475-E486.
322. Peyot M.L., Pepin E., Lamontagne J., Latour M.G., Zarrouki B., Lussier R., Pineda M., Jetton T.L., Madiraju S.R., Joly E., Prentki M. Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass // *Diabetes.* – 2010. – V. 59(9). – P. 2178-2187.
323. Peyssonnaud C., Zinkernagel A.S., Schuepbach R.A., Rankin E., Vaultont S. Haase V.H., Nizet V., Johnson R.S. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V. 117. – P. 1926–1932.
324. Piccinelli P., Samuelsson T. Evolution of the iron-responsive element // *RNA.* – 2007. – V. 13. – P. 952–966.
325. Pietrangelo A., Dierssen U., Valli L., Garuti C., Rump A., Corradini E., Ernst M., Klein C., Trautwein C. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo // *Gastroenterology.* – 2007. – V. 132(1). – P. 294-300.
326. Pietrangelo A., Grandi R., Tripodi A., Tomasi A., Ceccarelli D., Ventura E., Masini A. Lipid composition and fluidity of liver mitochondria, microsomes and plasma membrane of rats with chronic dietary iron overload // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – V. 39(1). – P. 123-128.
327. Pinto J.P., Ribeiro S., Pontes H., Thowfeequ S., Tosh D., Carvalho F., Porto G. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha // *Blood.* – 2008. – V. 111(12). – P. 5727-5733.
328. Pizzimenti S., Ciamporcero E., Daga M., Pettazzoni P., Arcaro A., Cetrangolo G., Minelli R., Dianzani C., Lepore A., Gentile F., Barrera G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins // *Front. Physiol.* – 2013. – V. 4. – P. 242.
329. Poitout V., Amyot J., Semache M., Zarrouki B., Hagman D., Fontés G. Glucolipototoxicity of the pancreatic beta cell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – V. 1801(3). – P. 289-298.

330. Poitout V., Robertson R.P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity // *Endocrinology*. - 2002. - V. 143. - P. 339-342.
331. Poli M., Luscieti S., Gandini V., Maccarinelli F., Finazzi D., Silvestri L., Roetto A., Arosio P. Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation // *Haematologica*. - 2010. - V. 95(11). - P. 1832-1840.
332. Popova E.A., Mironova R.S., Odjakova M.K. Non-enzymatic glycosylation and deglycating enzymes // *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* - 2010. - V. 24(3). - P. 1928-1935.
333. Porter J.B., Garbowski M. The pathophysiology of transfusional iron overload // *Hematol Oncol. Clin. North. Am.* - 2014. - V. 28(4). - P. 683-701.
334. Poss K.D., Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1997. - V. 94(20). - P. 10919-10924.
335. Potashnik R., Kozlovsky N., Ben-Ezra S, Rudich A., Bashan N. Regulation of glucose transport and GLUT-1 expression by iron chelators in muscle cells in culture // *Am. J. Physiol.* - 1995. - V. 269. - P. E1052–E1058.
336. Preza G.C., Pinon R., Ganz T., Nemeth E. Cellular catabolism of the iron-regulatory peptide hormone hepcidin // *PLoS. One*. - 2013. - V. 8(3). - P. e58934.
337. Qi Y., Xu Z., Zhu Q., Thomas C., Kumar R., Feng H., Dostal D.E., White M.F., Baker K.M., Guo S. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38 α MAPK during insulin resistance // *Diabetes*. - 2013. - V. 62(11). - P. 3887-3900.
338. Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Min S.H., Chattopadhyay S., Tsai E., Sandoval C., Zhao R., Akabas M.H., Goldman I.D. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption // *Cell*. - 2006. - V. 127. - P. 917–928.
339. Qian J., Chen S., Huang Y., Shi X., Liu C. PGC-1 α regulates hepatic hepcidin expression and iron homeostasis in response to inflammation // *Mol. Endocrinol.* - 2013. - V. 27(4). - P. 683–692.
340. Qiao B., Sugianto P., Fung E., Del-Castillo-Rueda A., Moran-Jimenez M.J., Ganz T., Nemeth E. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination // *Cell Metab.* - 2012. - V. 15. - P. 918–924.

341. Rahtu-Korpela L., Määttä J., Dimova E. Y., Hörkkö S., Gylling H., Walkinshaw G., Hakkola J., Kivirikko K. I., Myllyharju J., Serpi R., Koivunen P. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 inhibition protects against development of atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2016. – 36(4). – P. 608-617.
342. Rajagopal A., Rao A.U., Amigo J., Tian M., Upadhyay S.K., Hall C., Uhm S., Mathew M.K., Fleming M.D., Paw B.H., Krause M., Hamza I. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins // *Nature.* – 2008. – V. 453. – P. 1127–1131.
343. Ranjan M., Nayak S., Sashidhar B. R. Immunochemical detection of glycated β - and γ -crystallins in lens and their circulating autoantibodies (IgG) in streptozocin induced diabetic rat // *Mol. Vis.* – 2006. – V. 12. – P.1077-1085.
344. Rasmussen B.B., Holmbäck U.C., Volpi E., Morio-Liondore B., Paddon-Jones D., Wolfe R.R. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 110(11). – P. 1687–1693.
345. Ravichandran L.V., Esposito D.L., Chen J., Quon M.J. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276(5). – P. 3543-3549.
346. Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay for caeruloplasmin // *J. Lab. Clin. Med.* - 1961. - V. 58. - P. 161.
347. Reddy S., Young M., Poole C.A., Ross J.M. Loss of glucose transporter-2 precedes insulin loss in the nonobese diabetic and the low-dose streptozotocin mouse models: a comparative immunohistochemical study by light and confocal microscopy // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 1998. – V. 111(1). – P. 9-19.
348. Ren Y., Tian H., Li X., Liang J., Zhao G. Elevated serum ferritin concentrations in a glucose-impaired population and in normal glucose tolerant first-degree relatives in familial type 2 diabetic pedigrees // *Diabetes Care.* – 2004. – V. 27(2). – P. 622-623.
349. Revers R.R., Fik R., Griffin J., Olefsky J.M., Kolterman O.G. Influence of hyperglycemia on insulin's in vivo effects in Type II diabetes // *J. Clin. Invest.* - 1984. - V. 73. - P. 664–672.
350. Rice E.W. Evaluation of the role of ceruloplasmin as an acute-phase reactant // *Clin. Chim. Acta.* - 1961. - V. 6. - P. 652-655.

351. Richard J.P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates // *Biochem. Soc. Trans.* – 1993. – V. 21(2). – P. 549-553.
352. Rishi G., Wallace D.F., Subramaniam V.N. Hepcidin: regulation of the master iron regulator // *Biosci. Rep.* – 2015. – V. 35(3). – P. e00192.
353. Rolfs A., Kvietikova I., Gassmann M., Wenger R.H. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1 // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 20055–20062.
354. Roomp K., Kristinsson H., Schwartz D., Ubhayasekera K., Sargsyan E., Manukyan L., Chowdhury A., Manell H., Satagopam V., Groebe K., Schneider R., Bergquist J., Sanchez J.-C., Bergsten P. Combined lipidomic and proteomic analysis of isolated human islets exposed to palmitate reveals time-dependent changes in insulin secretion and lipid metabolism // *PLoS. One.* – 2017. – V. 12(4). – P. e0176391.
355. Rouault T.A., Stout C.D., Kaptain S., Harford J.B., Klausner R.D. Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications // *Cell.* – 1991. – V. 64. – P. 881–883.
356. Rolo A.P., Palmeira C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2006. – V. 212(2). – P.167-178.
357. Roy C.N., Andrews N.C. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – V. 10(20). – P. 2181-2186.
358. Ryden L. Single-chain structure of human ceruloplasmin // *Eur. J. Biochem.* - 1972. - V. 26. - P. 380-386.
359. Saad M.F., Knowler W.C., Pettitt D.J., Nelson R.G., Charles M.A., Bennett P.H. A two-step model for development of non-insulin-dependent diabetes // *Am. J. Med.* – 1991. – V. 90. – P. 229-235.
360. Saad M.F., Knowler W.C., Pettitt D.J., Nelson R.G., Mott D.M., Bennett P.H. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes // *Lancet.* – 1989. – V. 1(8651). – P. 1356-1359.
361. Sadlon T.J., Dell'Oso T., Surinya K.H., May B.K. Regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase expression during erythropoiesis // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1999. – V. (10). – P. 1153-1167.
362. Sakakibara S., Aoyama Y. Dietary iron-deficiency up-regulates hephaestin mRNA level in small intestine of rats // *Life Sci.* – 2002. – V. 70(26). – P. 3123-3129.

363. Salahudeen A.A., Thompson J.W., Ruiz J.C., Ma H.W., Kinch L.N., Li Q., Grishin N.V., Bruick R.K. An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis // *Science*. – 2009. – V. 326(5953). – P. 722-726.
364. Salonen J.T., Tuomainen T.P., Nyssönen K., Lakka H.M., Punnonen K. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study // *BMJ*. – 1998. – V. 317(7160). – P. 727.
365. Samokyszyn V.M., Miller D.M., Reif, D.W., Aust S.D. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin // *J. Biol. Chem.* - 1989. - V. 264. - P. 21-26.
366. Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G., Schneider T. R., Anashkin V. A., Kozlov S. O., Kolmakov N. N., Vasilyev V. B. Rat ceruloplasmin: a new labile copper binding site and zinc/copper mosaic // *Metallomics*. – 2017. – V. 9(12). – P. 1828-1838.
- 367.
368. San Martin A., Foncea R., Laurindo F.R., Ebensperger R., Griendling K.K., Leighton F. Nox1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation end-products // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – V. 42(11). – P. 1671-1679.
369. Sanchez M., Galy B., Muckenthaler M.U., Hentze M.W. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2007. – V. 14(5). – P. 420-426.
370. Sanda G. M., Toma L., Barbalata T., Moraru O. E., Niculescu L. S., Sima A. V., Stancu C. S. Clusterin, paraoxonase 1, and myeloperoxidase alterations induce high-density lipoproteins dysfunction and contribute to peripheral artery disease; aggravation by type 2 diabetes mellitus // *Biofactors*. – 2022. – V. 48(2). – P. 454-468.
371. Santos P.C., Dinardo C.L., Cançado R.D., Schettert I.T., Krieger J.E., Pereira A.C. Non-HFE hemochromatosis // *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* – 2012. – V. 34(4). – P. 311-316.
372. Saravanan G., Ponmurugan P., Begum M. S. Effect of S-allylcysteine, a sulphur containing amino acid on iron metabolism in streptozotocin induced diabetic rats // *J. Trace. Elem. Med. Biol.* – 2013. – V. 27(2). – P.143-147.
373. Sarkar J., Seshadri V., Tripoulas N.A., Ketterer M.E., Fox P.L. Role of ceruloplasmin in macrophage iron efflux during hypoxia // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. - P. 44018-44024.
374. Satomi Y., Shimonishi Y., Takao T. N-glycosylation at Asn(491) in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 576(1–2). – P. 51–56.

375. Schade A.L., Caroline L. An iron-binding component in human blood plasma // *Science*. – 1946. – V. 104. – P. 340-341.
376. Schasfoort R.B.M., Tudos A.J. Handbook of Surface Plasmon Resonance // Cambridge: The Royal Society of Chemistry. – 2008. – P. 403.
377. Schmidt A. M., Vianna M., Gerlach M., Brett J., Ryan J., Kao J., Esposito C., Hegarty H., Hurleyp W., Clauss M., Wang F., Pan Y.-C. E., Tsang T. C., Stern D. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267(21). – P. 14987-14997.
378. Sebastian S., Wölk M., Hoffmann R. Differentiation and quantitation of coeluting isomeric amadori and heyns peptides using sugar-specific fragment ion ratios // *Anal. Chem.* – 2022. – V. 94(22). – P. 7909-7917.
379. Seshadri V., Fox P.L., Mukhopadhyay C.K. Dual role of insulin in transcriptional regulation of the acute phase reactant ceruloplasmin // *J. Biol. Chem.* - 2002. - V. 277. - P. 27903-27911.
380. Sharma V.K., Tumbapo A., Pant V., Aryal B., Shrestha S., Yadav B.K., Tuladhar E.T., Bhattarai A., Raut M. Ceruloplasmin, a potential marker for glycemic status and its relationship with lipid profile in Type II diabetes mellitus // *Asian J. Med. Sci.* - 2018. – V. 9(2). – P. 13–18.
381. Shaw G.C., Cope J.J., Li L., Corson K., Hersey C., Ackermann G.E., Gwynn B., Lambert A.J., Wingert R.A., Traver D., Trede N.S., Barut B.A., Zhou Y., Minet E., Donovan A., Brownlie A., Balzan R., Weiss M.J., Peters L.L., Kaplan J., Zon L.I., Paw B.H. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation // *Nature*. – 2006. – V. 440. – P. 96–100.
382. Sheftel A., Stehling O., Lill R. Iron-sulfur proteins in health and disease // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2010. – V. 21(5). – P. 302-314.
383. Sheftel A.D., Zhang A.S., Brown C., Shirihai O.S., Ponka P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion // *Blood*. – 2007. – V. 110. – P. 125–132.
384. Shi H., Bencze K.Z., Stemmler T.L., Philpott C.C. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin // *Science*. – 2008. – V. 320. – P. 1207–1210.
385. Shimabukuro M., Zhou Y.T., Levi M., Unger R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – V. 95(5). – P. 2498-2502.

386. Shin C.S., Moon B.S., Park K.S., Kim S.Y., Park S.J., Chung M.H., Lee H.K. Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients // *Diabetes Care*. – 2001. – V. 24(4). – P. 733-737.
387. Sibille J.C., Kondo H., Aisen P. Uptake of ferritin and iron bound to ferritin by rat hepatocytes: modulation by apotransferrin, iron chelators and chloroquine // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1989. – V. 1010. – P. 204-209.
388. Silva A.M.N, Coimbra J.T.S, Castro M.M., Oliveira Â., Brás N.F., Fernandes P.A., Ramos M.J., Rangel M. Determining the glycation site specificity of human holo-transferrin // *J. Inorg. Biochem.* – 2018. – V. 186. – P. 95-102.
389. Silva A.M.N, Rangel M. The (Bio)Chemistry of Non-Transferrin-Bound Iron // *Molecules*. – 2022. – V. 27(6). – P. 1784.
390. Silva M., Magalhães C. L. B., Oliveira R. P., Silva M. E., Pedrosa M. L. Differential expression of iron metabolism proteins in diabetic and diabetic iron-supplemented rat liver // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2012. – V. 26(3). – P. 123-129.
- 391.
392. Silvestri¹ L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis // *Blood*. – 2008. – V. 111(2). – P. 924-931.
393. Silvestri² L., Pagani A., Nai A., De Domenico I., Kaplan J., Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin // *Cell Metab.* – 2008. – V. 8. – P. 502–511.
394. Singh V.P., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. Advanced glycation end products and diabetic complications // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* – 2014. – V. 18(1). – P. 1–14.
395. Soe-Lin S., Apte S.S., Andriopoulos B. Jr., Andrews M.C., Schranzhofer M., Kahawita T., Garcia-Santos D., Ponka P. Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106(14). – P. 5960-5965.
396. Sokolov A. V., Isakova-Sivak I. N., Mezhenkaya D. A., Kostevich V. A., Gorbunov N. P., Elizarova A. Yu., Matyushenko V. A., Berson Yu. M., Grudinina N. A., Kolmakov N. N., Zabrodskaya Y. A., Komlev A. S., Semak I. V., Budevich A. I., Rudenko L. G., Vasilyev V. B. Molecular mimicry of the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein: from the interaction of spike-specific antibodies with transferrin and lactoferrin to the antiviral effects of human recombinant lactoferrin // *Biometals*. – 2022. – V. – P. 1-26.

397. Sokooti S., Dam W. A., Szili-Torok T., Gloerich J., van Gool A. J., Post A., de Borst M. H., Gansevoort R. T., Heerspink H. J. L., Dullaart R. P. F., Bakker S. J. L. Fasting proinsulin independently predicts incident type 2 diabetes in the general population // *J. Pers. Med.* – 2022. – V. 12(7). – P. 1131.
398. Somwar R., Perreault M., Kapur S., Taha C., Sweeney G., Ramlal T., Kim D.Y., Keen J., Cote C.H., Klip A., Marette A. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport // *Diabetes.* – 2000. – V. 49. – P. 1794–1800.
399. Squitti R., Mendez A.J., Simonelli I., Ricordi C. Diabetes and Alzheimer's Disease: Can Elevated Free Copper Predict the Risk of the Disease? // *J. Alzheimers. Dis.* – 2017. – V. 56(3). – P. 1055-1064.
400. Spégel P., Malmgren S., Sharoyko V. V., Newsholme P., Koeck T., Mulder H. Metabolomic analyses reveal profound differences in glycolytic and tricarboxylic acid cycle metabolism in glucose-responsive and -unresponsive clonal β -cell lines // *Biochem. J.* – 2011. – V. 435(1). – P. 277-284.
401. Stenkamp R.E. Dioxygen and Hemerythrin // *Chem. Rev.* – 1994. – V. 94(3). – P. 715–726.
402. Stocker P., Cassien M., Vidal N., Thétiot-Laurent S., Pietri S. A fluorescent homogeneous assay for myeloperoxidase measurement in biological samples. A positive correlation between myeloperoxidase-generated HOCl level and oxidative status in STZ-diabetic rats // *Talanta.* – 2017. – V. 170. – P. 119-127.
403. Stoj C., and Kosman D.J. Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 554. – P. 422-426.
404. Suriawinata E., Mehta K. J. Iron and iron-related proteins in COVID-19 // *Clin. Exp. Med.* – 2022. – P. 1-23.
405. Syed B.A., Beaumont N.J., Patel A., Naylor C.E., Bayele H.K., Joannou C.L., Rowe P.S., Evans, R.W., Srai S.K. Analysis of the human hephaestin gene and protein: comparative modelling of the N-terminus ecto-domain based upon ceruloplasmin // *Protein Eng.* – 2002. – V. 15. – P. 205-214.
406. Swe M. T., Thongnak L., Jaikumkao K., Pongchaidecha A., Chatsudthipong V., Lungkaphin A. Dapagliflozin not only improves hepatic injury and pancreatic endoplasmic reticulum stress, but also induces hepatic gluconeogenic enzymes expression in obese rats // *Clin. Sci. (Lond).* – 2019. – V. 133(23). – P. 2415-2430.
407. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas // *Physiol. Res.* – 2001. – V. 50(6). – P. 537-546.

408. Tajiri Y., Möller C., Grill V. Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function // *Endocrinology*. – 1997. – V. 138(1). – P. 273-280.
409. Tacke F., Nuraldeen R., Koch A., Strathmann K., Hutschenreuter G., Trautwein C., Strnad P. Iron parameters determine the prognosis of critically ill patients // *Crit. Care Med.* – 2016. – V. 44(6). – P. 1049-1058.
410. Tang X., Yang M., Duan Z., Liao Z., Liu L., Cheng R., Fang M., Wang G., Liu H., Xu J., Kamau P. M., Zhang Z., Yang L., Zhao X., Peng X., Lai R. Transferrin receptor is another receptor for SARS-CoV-2 entry // *bioRxiv*. 2020.
411. Tangudu N.K., Buth N., Strnad P., Cirstea I.C., Spasić M.V. Deregulation of hepatic Mek1/2–Erk1/2 signaling module in iron overload conditions // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2019. – V. 12(2). – P. 70.
412. Tanner L.I., Lienhard G.E. Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 8975–8980.
413. Tanno T., Bhanu N.V., Oneal P.A., Goh S.H., Staker P., Lee Y.T., Moroney J.W., Reed C.H., Luban N.L., Wang R.H., Eling T.E., Childs R., Ganz T., Leitman S.F., Fucharoen S., Miller J.L. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13(9). – P. 1096-1101.
414. Tanno T., Porayette P., Sripichai O., Noh S.J., Byrnes C., Bhupatiraju A., Lee Y.T., Goodnough J.B., Harandi O., Ganz T., Paulson R.F., Miller J.L. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells // *Blood*. – 2009. – V. 114(1). – P. 181-186.
415. Takahashi N., Ortel T.L., Putnam F.W. Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1984. – V. 81(2). – P. 390–394.
416. Takayama Y., Aoki R. Roles of lactoferrin on skin wound healing // *Biochem. Cell. Biol.* – 2012. – V. 90(3). – P. 497-503.
417. Teng C. T., Pentecost B. T., Marshall A., Solomon A., Bowman B. H., Lalley P. A., Naylor S. L. Assignment of the lactotransferrin gene to chromosome 3 and mouse chromosome 9 // *Somat. Cell Mol. Genet.* – 1987. – V. 13. – P. 689-693.
418. Terres-Martos C., Navarro-Alarcon M., Martín-Lagos F., Lopez-Ga De La Serrana H., Perez-Valero V., Lopez-Martínez M.C. Serum zinc and copper concentrations and Cu/Zn ratios in patients with hepatopathies or diabetes // *J. Adv. Lab. Res. Biol.* – 1998. – V. 12(1). – P. 44–49.

419. Thangarajah H., Vial I.N., Grogan R.H., Yao D., Shi Y., Januszyk M., Galiano R.D., Chang E.I., Galvez M.G., Glotzbach J.P., Wong V.W., Brownlee M., Gurtner G.C. HIF-1 α dysfunction in diabetes // *Cell. Cycle.* – 2010. – V. 9(1). – P. 75-79.
420. Thomsen J. H., Etzerodt A., Svendsen P., Moestrup S. K. The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2013. – V. 2013. – P. 523652.
421. Thomson A.M., Rogers J.T., Leedman P.J. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1999. – V. 31. – P. 1139–1152.
422. Thorburn A.W., Gumbiner B., Bulacan F., Brechtel G., Henry R.R. Multiple defects in muscle glycogen synthase activity contribute to reduced glycogen synthesis in non- insulin-dependent diabetes mellitus // *J. Clin. Invest.* – 1991. – V. 87. – P. 490–495.
423. Thorstensen K., Romslo I. The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake // *Biochem. J.* – 1990. – V. 271(1). – P. 1–10.
424. Tigchelaar C., van Zuylen M. L., Hulst A. H., Preckel B., van Beek A. P., Kema I. P., Hermanides J., Absalom A. R. Elevated cerebrospinal fluid glucose levels and diabetes mellitus are associated with activation of the neurotoxic polyol pathway // *Diabetologia.* – 2022. – V. 65(7). – P. 1098-1107.
425. Tolosano E. Increasing serum transferrin to reduce tissue iron overload due to ineffective erythropoiesis // *Haematologica.* – 2015. – V. 100(5). – P. 565-566.
426. Tong W.H., Rouault T.A. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis // *Cell Metab.* – 2006. – V. 3. – P. 199–210.
427. Topham R.W., Frieden E. Identification and purification of a non-ceruloplasmin ferroxidase of human serum // *J. Biol. Chem.* – 1970. – V. 245(24). – P. 6698-6705.
428. Touarsa F., Mohamed D. A., Onka B., Rostoum S., Ech-Cherif El Kettani N., Fikri M., Jiddane M. Brain iron accumulation on MRI revealing aceruloplasminemia: a rare cause of simultaneous brain and systemic iron overload // *BJR. Case. Rep.* – 2022. – V. 8(5). – P. 20220035.
429. Truksa J., Lee P., Beutler E. Two BMP responsive elements, STAT, and bZIP/HNF4/ COUP motifs of the hepcidin promoter are critical for BMP, SMAD1, and HJV responsiveness // *Blood.* – 2009. – V. 113. – P. 688–695.

430. Truman-Rosentsvit M., Berenbaum D., Spektor L., Cohen L.A., Belizowsky-Moshe S., Lifshitz L., Ma J, Li W., Kesselman E., Abutbul-Ionita I., Danino D., Gutierrez L., Li H., Li K., Lou H., Regoni M., Poli M., Glaser F., Rouault T.A., Meyron-Holtz E.G. Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways // *Blood*. – 2018. – V. 131(3). – P. 342-352.
431. Utzschneider K.M., Prigeon R.L., Carr D.B., Hull R.L., Tong J., Shofer J.B., Retzlaff B.M., Knopp R.H., Kahn S.E. Impact of differences in fasting glucose and glucose tolerance on the hyperbolic relationship between insulin sensitivity and insulin responses // *Diabetes Care*. – 2006. – V. 29(2). – P. 356-362.
432. Valore E.V., Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin // *Blood Cells Mol. Dis*. – 2008. – V. 40(1). – P. 132–138.
433. Van Campenhout A., Van Campenhout C., Lagrou A.R., Manuel-Y-Keenoy B. Effects of in vitro glycation on Fe³⁺ binding and Fe³⁺ isoforms of transferrin // *Clin. Chem*. – 2004. – V. 50(9). – P. 1640-1649.
434. Van Dijk M. C., Ziere G.J., van Berkel T. J. Characterization of the chylomicron-remnant-recognition sites on parenchymal and Kupffer cells of rat liver. Selective inhibition of parenchymal cell recognition by lactoferrin // *Eur. J. Biochem*. – 1992. – V. 205(2). – P. 775-784.
435. Van Kampen E. J., Zijlstra W. G. Determination of hemoglobin and its derivatives // *Adv. Clin. Chem*. – 1965. – V. 8. – P. 141-187.
436. Vander Jagt D.L., Robinson B., Taylor K.K., Hunsaker L.A. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications // *J. Biol. Chem*. – 1992. – V. 267(7). – P. 4364-4369.
437. Vanin A.F. Physico-chemistry of dinitrosyl iron complexes as a determinant of their biological activity // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. – V. 22. – P. 10356.
438. Vashchenko G., MacGillivray R.T. Multi-copper oxidases and human iron metabolism // *Nutrients*. – 2013. – V. 5(7). – P. 2289–2313.
439. Vashisht A.A., Zumbrennen K.B., Huang X., Powers D.N., Durazo A., Sun D., Bhaskaran N., Persson A., Uhlen M., Sangfelt O., Spruck C., Leibold E.A., Wohlschlegel J.A. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase // *Science*. – 2009. – V. 326(5953). – P.718-721.
440. Verga Falzacappa M. V., Muckenthaler M. U. Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide // *Gene*. – 2005. – V. 364. – P. 37-44.

441. Volz K. The functional duality of iron regulatory protein 1 // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2008. – V. 18(1). – P. 106-111.
442. Walden W.E., Selezneva A.I., Dupuy J., Volbeda A., Fontecilla-Camps J.C., Theil E.C., Volz K. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA // *Science.* – 2006. – V. 314(5807). – P.1903-1908.
443. Wang B., Timilsena Y. P., Blanch E., Adhikari B. Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion // *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* – 2019. – V. 59(4). – P. 580-596.
444. Wang H., Li H., Jiang X., Shi W., Shen Z., Li M. Hepcidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin-induced diabetic rats // *Diabetes.* – 2014. – V. 63. – P. 1506-1518.
445. Wang J., Chen G., Muckenthaler M., Galy B., Hentze M.W., Pantopoulos K. Iron-mediated degradation of IRP2, an unexpected pathway involving a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase activity // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V. 24(3). – P. 954-965.
446. Wang R.H., Li C., Xu X., Zheng Y., Xiao C., Zerfas P., Cooperman S., Eckhaus M., Rouault T., Mishra L., Deng C.X. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression // *Cell Metab.* – 2005. – V. 2. – P. 399–409.
447. Wang X., Wen Z., Cao H., Luo J., Shuai L., Wang C., Ge J., Wang X., Bu Z., Wang J. Transferrin receptor protein 1 cooperates with mglur2 to mediate the internalization of rabies virus and SARS-CoV-2 // *J. Virol.* – 2023. – V. 97(2). – P. e0161122.
448. Wang Z., Li C., Ellenburg M., Soistman E., Ruble J., Wright B., Ho J.X., Carter D.C. Structure of human ferritin L chain // *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2006. – V. 62(Pt 7). – P. 800-806.
449. Ward D.M., Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: Expression and regulation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. - V. 1823. - P. 1426-1433.
450. Ward R.J., Ramsey M.H., Dickson D.P.E., Florence A., Crichton R.R. Chemical and structural characterisation of iron cores of haemosiderins isolated from different sources // *Eur. J. Biochem.* - 1992. - V. 209. - P. 847–850.
451. Wautier M.P., Chappey O., Corda S., Stern D.M., Schmidt A.M., Wautier J.L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – V. 280(5). – P. E685-694.
452. Weyer C., Hanson R.L., Tataranni P.A., Bogardus C., Pratley R.E. A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin

resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia // *Diabetes*. – 2000. – V. 49(12). – P. 2094-2101.

453. Whitehead J.P., Clark S.F., Urso B., James D.E. Signalling through the insulin receptor // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – V. 12(2). – P. 222-228.

454. Wyman S., Simpson R.J., McKie A.T., Sharp P.A. Dcytb (Cybrd1) functions as both a ferric and a cupric reductase in vitro // *FEBS Lett.* – 2008. – V. 582(13). – P. 1901-1906.

455. Xia Y., Babitt J.L., Sidis Y., Chung R.T., Lin H.Y. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin // *Blood*. – 2008. – V. 111(10). – P. 5195-5204.

456. Xiao Y., Zhu C., Jiang F., Gao Q., Lu H., Wang C., Wei L. Novel ceruloplasmin gene mutation causing aceruloplasminemia with diabetes in a Chinese woman: a case report // *Ann. Palliat. Med.* – 2022. – V. 11(7). – P. 2516-2522.

457. Xie H., Zhang C., Liu D., Yang Q., Tang L., Wang T., Tian H., Lu L., Xu J.-Y., Gao F., Wang J., Jin C., Li W., Xu G., Xu G.-T., Zhang J. Erythropoietin protects the inner blood-retinal barrier by inhibiting microglia phagocytosis via Src/Akt/cofilin signalling in experimental diabetic retinopathy // *Diabetologia*. – 2021. – V. 64(1). – P. 211-225.

458. Xu C., Sun S., Johnson T., Qi R., Zhang S., Zhang J., Yang K. The glutathione peroxidase Gpx4 prevents lipid peroxidation and ferroptosis to sustain Treg cell activation and suppression of antitumor immunity // *Cell. Rep.* – 2021. – V. 35(11). – P. 109235.

459. Yahaya T. O., Salisu T. F. A review of type 2 diabetes mellitus predisposing genes // *Curr. Diabetes. Rev.* – 2019. – V. 16(1). – P. 52-61.

460. Yamashita K., Koide N., Endo T., Iwaki Y., Kobata A. Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V. 264(5). – P. 2415-2423.

461. Yamashita S., Abe A., Noma A. Sensitive, direct procedures for simultaneous determinations of iron and copper in serum, with use of 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)-phenol (nitro-PAPS) as ligand // *Clin. Chem.* – 1992. – V. 38. – P. 1373-1375.

462. Yang F., Lum J.B., McGill J.R., Moore C.M., Naylor S.L., van Bragt P.H., Baldwin W.D., Bowman B.H. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1984. – V. 81. – P. 2752-2756.

463. Yang H., Liu C.N., Wolf R.M., Ralle M., Dev S., Pierson H., Askin F., Steele K.E., Magnuson T.H., Schweitzer M.A., Wong G.W., Lutsenko S. Obesity is

associated with copper elevation in serum and tissues // *Metallomics*. – 2019. – V. 11(8). – P. 1363-1371.

464. Yang P., Wang D., Shi Y., Li M., Gao M., Yu T., Liu D., Zhang J., Wang J., Zhang X., Liu Y. Insulin-containing wound dressing promotes diabetic wound healing through stabilizing HIF-1 α // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – V. 8. – P. 592833.

465. Yashima H., Terasaki M., Sotokawauchi A., Matsui T., Mori Y., Saito T., Osaka N., Kushima H., Hiromura M., Ohara M., Fukui T., Yamagishi S. I.AGE-RAGE axis stimulates oxidized ldl uptake into macrophages through cyclin-dependent kinase 5-CD36 pathway via oxidative stress generation // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21(23). – P. 9263.

466. Yeh K.Y., Yeh M., Mims L., Glass J. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2009. – V. 296(1). – P. G55-65.

467. Yim H.S., Kang S.O., Hah Y.C., Chock P. B., Yim M. B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-crosslinked free radicals // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 28228-28233.

468. Young S.P., Aisen P. Tf receptors and the uptake and release of iron by isolated hepatocytes // *Hepatology*. – 1981. – V. 1. – P. 114-119.

469. Yuan T., Song S., Zhao T., Duo Y., Wang S., Gao J., Liu S., Dong Y., Li R., Fu Y., Zhao W. Patterns of insulin secretion during first-phase insulin secretion in normal chinese adults // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2021. – V. 12. – P. 738427.

470. Yue D.K., Morris K., McLennan S., Turtle J.R. Glycosylation of plasma protein and its relation to glycosylated hemoglobin in diabetes // *Diabetes*. – 1980. - V. 29. - P. 296-300.

471. Zacharski L.R., Shamayeva G., Chow B.K., DePalma R.G. Ferritin and percent transferrin saturation levels predict type 2 diabetes risk and cardiovascular disease outcomes // *Curr. Diabetes. Rev.* – 2017. – V. 13(4). – P. 428-436.

472. Zakharova E. T., Kostevich V. A., Sokolov A. V., Vasilyev V. B. Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha // *Biometals*. – 2012. – V. 25(6). – P. 1247-1259.

473. Zakharova E.T., Shavlovski M.M., Bass M.G., Gridasova A.A., Pulina M.O., De Filippis V., Beltramini M., Di Muro P., Salvato B., Fontana A., Vasilyev V.B., Gaitskhoki V.S. Interaction of lactoferrin with ceruloplasmin // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – V. 374. – P. 222-228.

474. Zakharova E. T., Sokolov A. V., Pavlichenko N. N., Kostevich V. A., Abdurasulova I. N., Chechushkov A. V., Voynova I. V., Elizarova A. Y., 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. Erythropoietin and Nrf2: key factors in the neuroprotection provided by apo-lactoferrin // *Biometals*. – 2018. – V. 31(3). – P. 425-443.

475. Zakin M.M. Regulation of transferrin gene expression // *FASEB J.* – 1992. – V. 6. – P. 3253-3258.

476. Zapata RC, Singh A, Pezeshki A, et al. Whey Protein Components - Lactalbumin and Lactoferrin - Improve Energy Balance and Metabolism. *Scientific reports*, 2017;7(1):9917.

477. Zhang D., Lv F.-L., Wang G.-H. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2018. – V. 22(16). – P. 5071-5076.

478. Zhang R., Huang X., Li Y., Yu Z., Wu Y., Zha B., Ding H., Zang S., Liu J. Serum ferritin as a risk factor for type 2 diabetes mellitus, regulated by liver transferrin receptor 2 // *Endocr. Connect.* – 2021. – V. 10(12). – P. 1513–1521.

479. Zhao N., Maxson J.E., Zhang R.H., Wahedi M., Enns C.A., Zhang A.S. Neogenin facilitates the induction of hepcidin expression by hemojuvelin in the liver // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291(23). – P. 12322–12335.

480. Zhao N., Zhang A.S., Enns C.A. Iron regulation by hepcidin // *J. Clin. Invest.* – 2013. – V. 123(6). – P. 2337-2343.

481. Zhang Y., Swanda R. V., Nie L., Liu X., Wang C., Lee H., Lei G., Mao C., Koppula P., Cheng W., Zhang J., Xiao Z., Zhuang L., Fang B., Chen J., Qian S.-B., Gan B. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12(1). – P. 1589.

482. Zhang Z., Liew C.W., Handy D.E., Zhang Y., Leopold J.A., Hu J., Guo L., Kulkarni R.N., Loscalzo J., Stanton R.C. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis // *FASEB. J.* – 2010. – V. 24(5). – P. 1497-505.

483. Zheng J., Chen M., Liu G., Xu E., Chen H. Ablation of hephaestin and ceruloplasmin results in iron accumulation in adipocytes and type 2 diabetes // *FEBS Lett.* – 2018. – V. 592(3). – P. 394-401.

484. Zhu Y., Liu Q., Zhou Z., Ikeda Y. Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration // *Stem. Cell Res. Ther.* – 2017. – V. 8. – P. 240.

485. Zou C., Liu X., Liu R., Wang M., Sui M., Mu S., Li L., Ji L., Xie R. Effect of the oral iron chelator deferiprone in diabetic nephropathy rats // *J. Diabetes.* – 2017. –V. 9(4). – P. 332-340.

ПРИЛОЖЕНИЕ

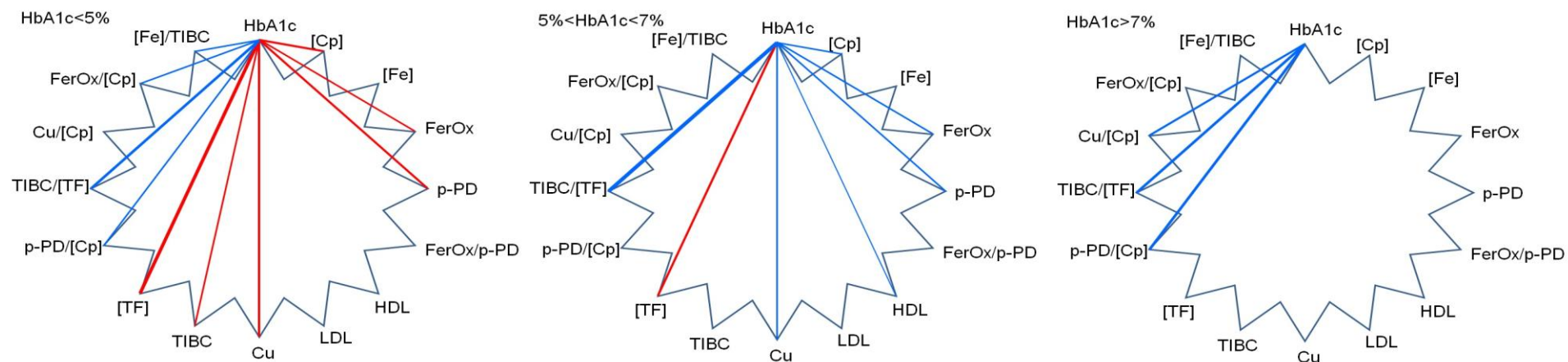


Рисунок 4-1. Круговая схема корреляционных связей между долей HbA1c и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

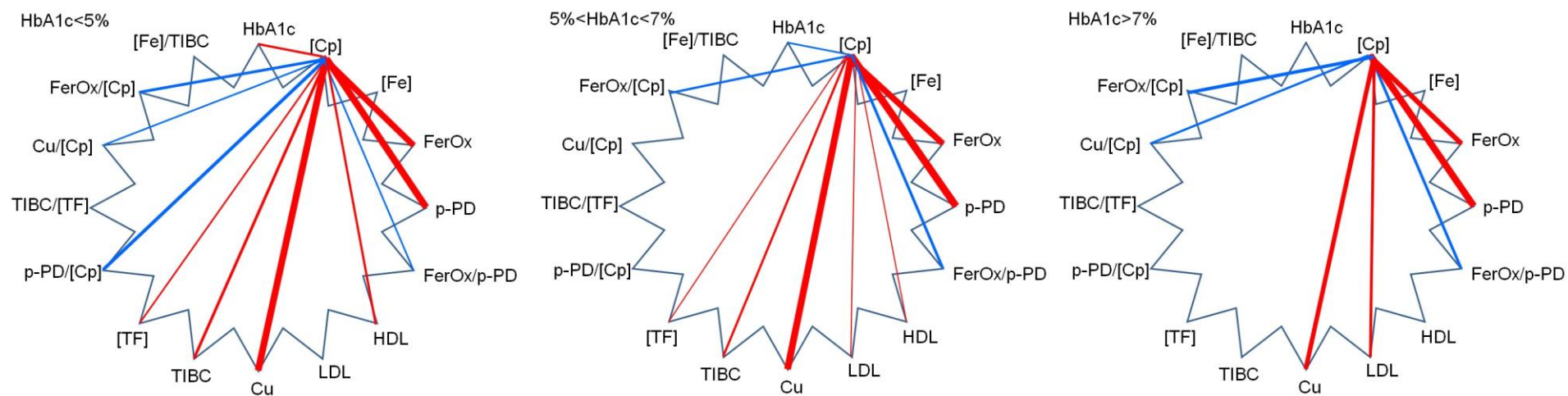


Рисунок 4-2. Круговая схема корреляционных связей между концентрацией Ср и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

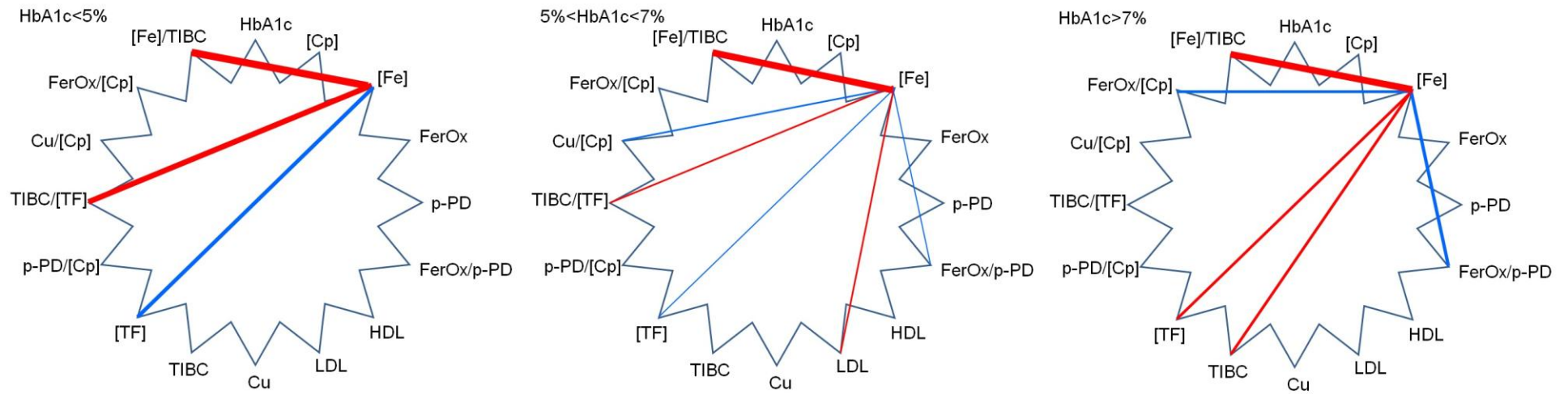


Рисунок 4-3. Круговая схема корреляционных связей между концентрацией железа и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

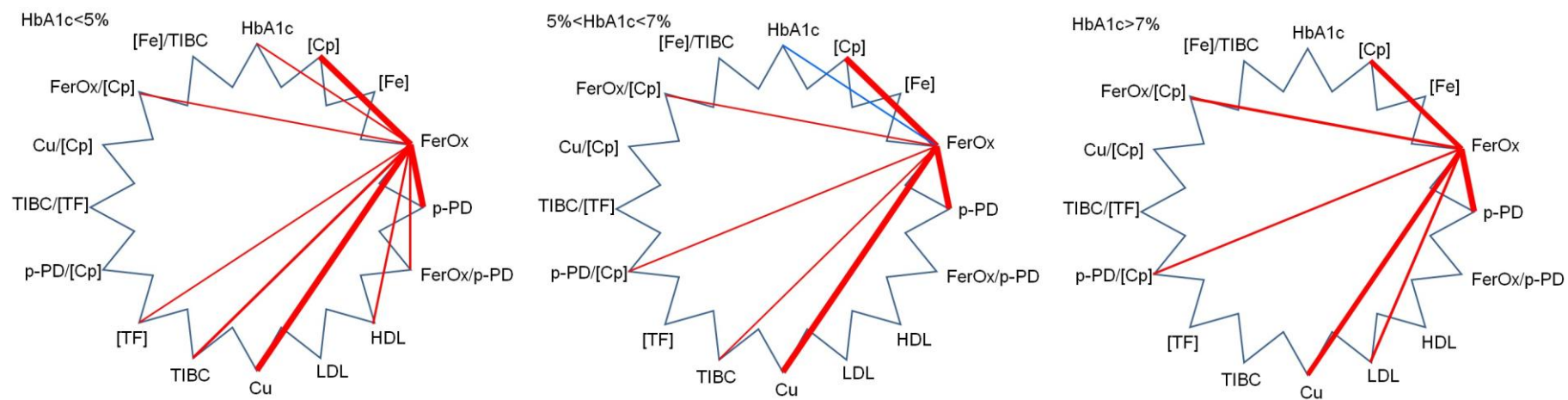


Рисунок 4-4. Круговая схема корреляционных связей между ферроксидазной активностью Ср и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

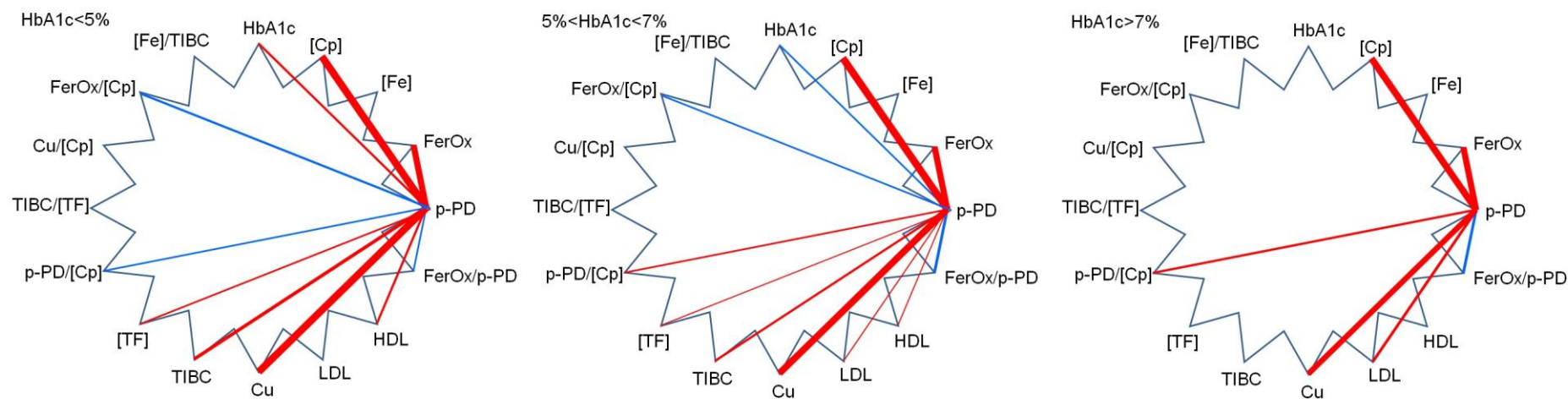


Рисунок 4-5. Круговая схема корреляционных связей между активностью Sr в отношении p-PD и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

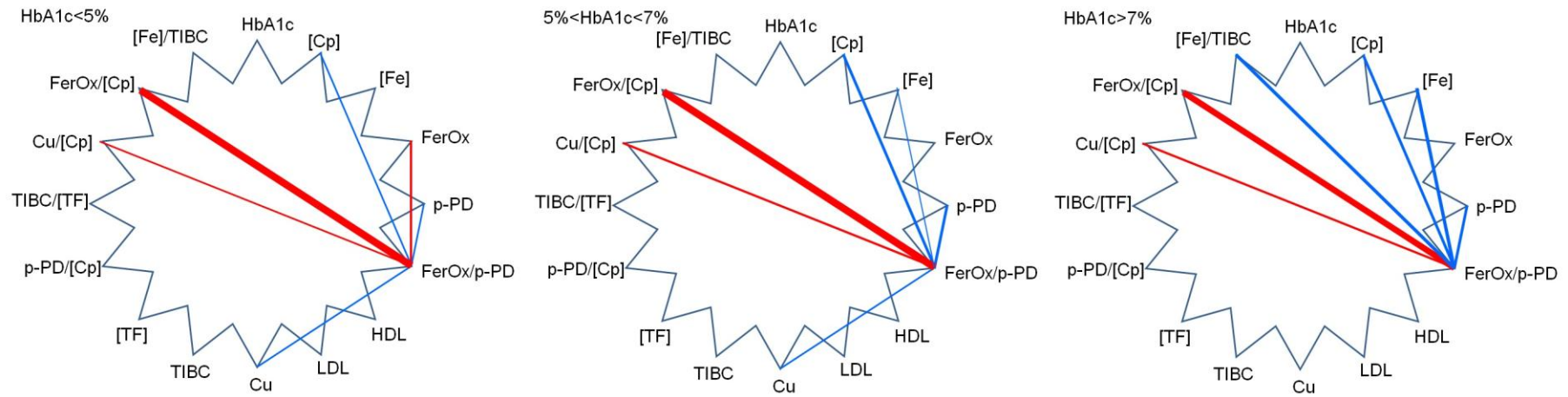


Рисунок 4-6. Круговая схема корреляционных связей между отношением ферроксидазной активности Ср к активности Ср в отношении p-PD и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

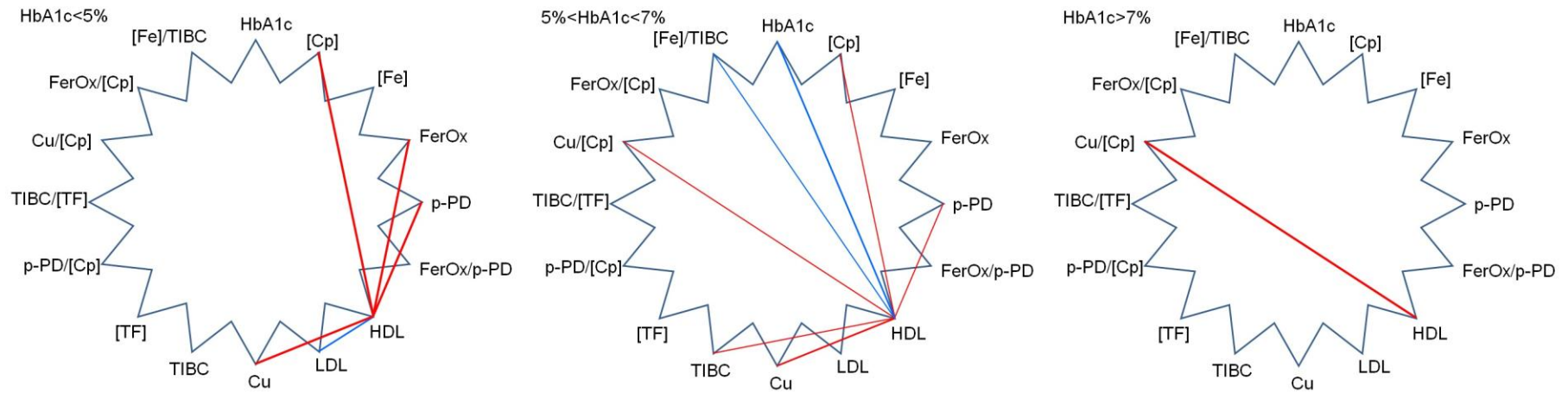


Рисунок 4-7. Круговая схема корреляционных связей между концентрацией HDL и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

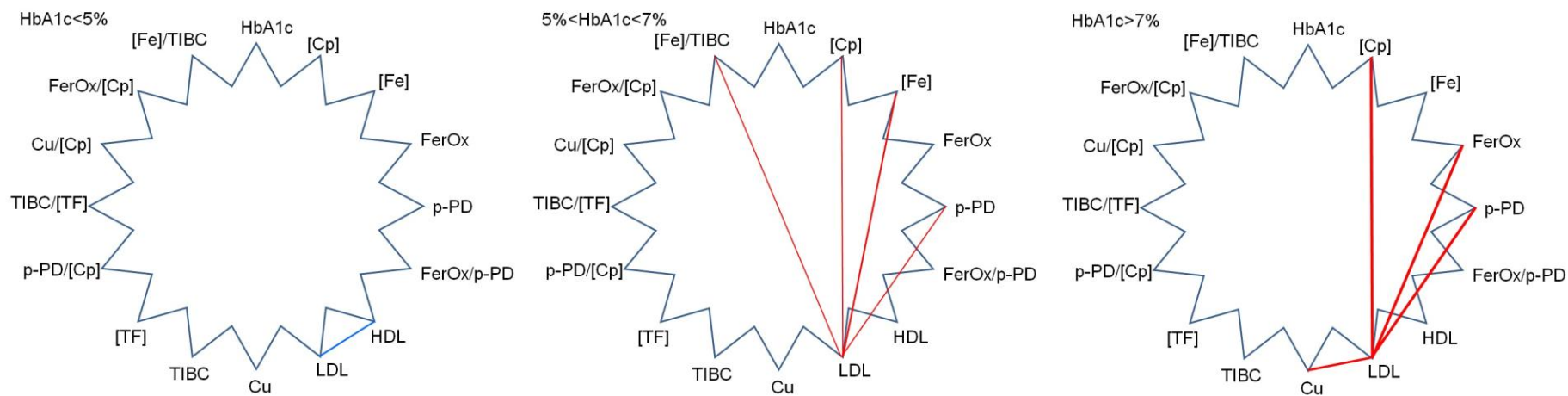


Рисунок 4-8. Круговая схема корреляционных связей между концентрацией LDL и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

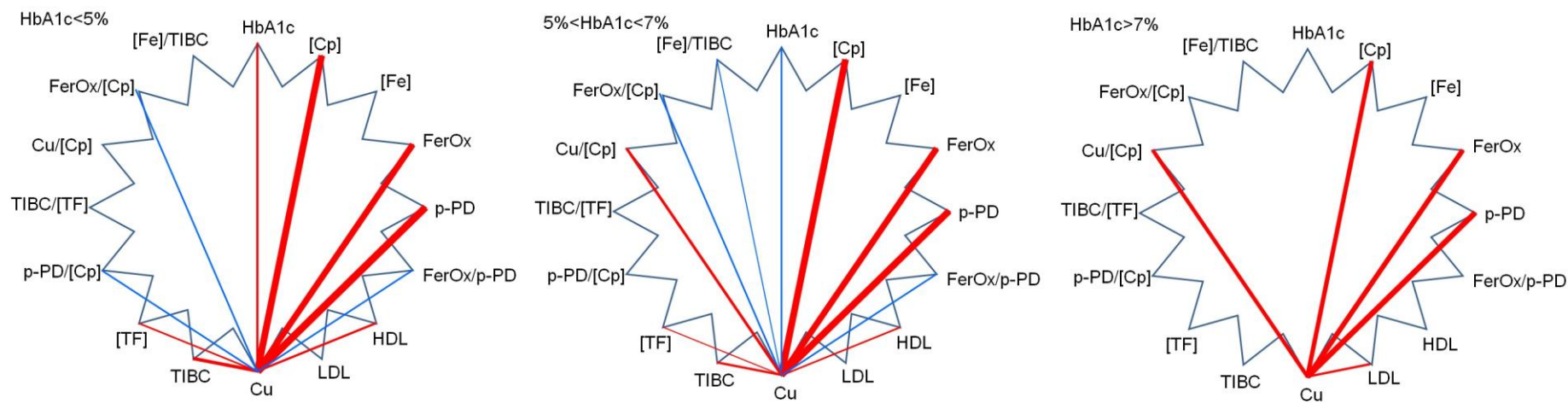


Рисунок 4-9. Круговая схема корреляционных связей между концентрацией меди и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

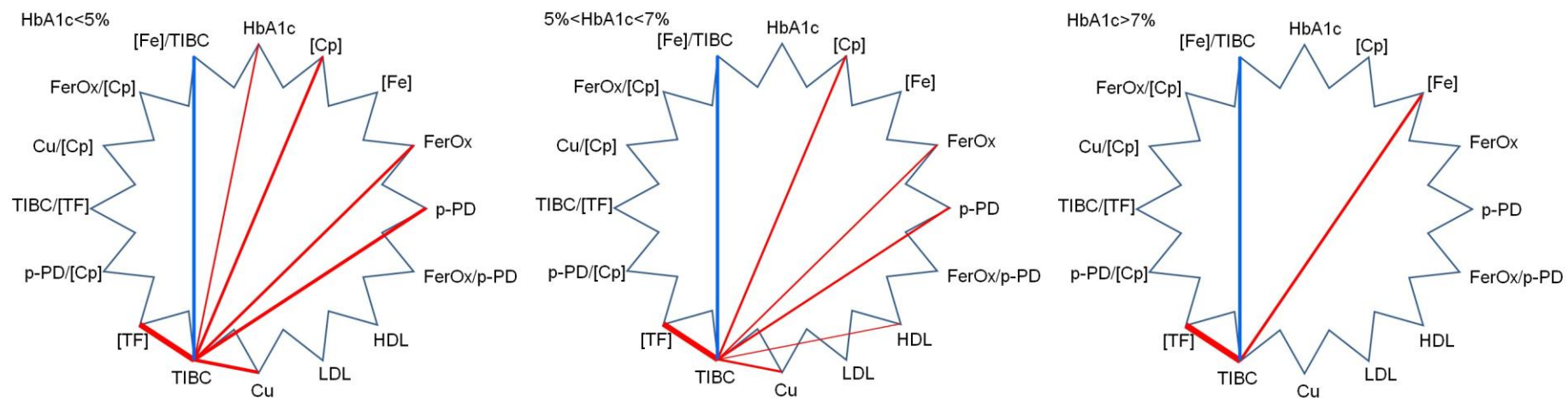


Рисунок 4-10. Круговая схема корреляционных связей между общей железосвязывающей способностью сыворотки крови (ТВС) и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

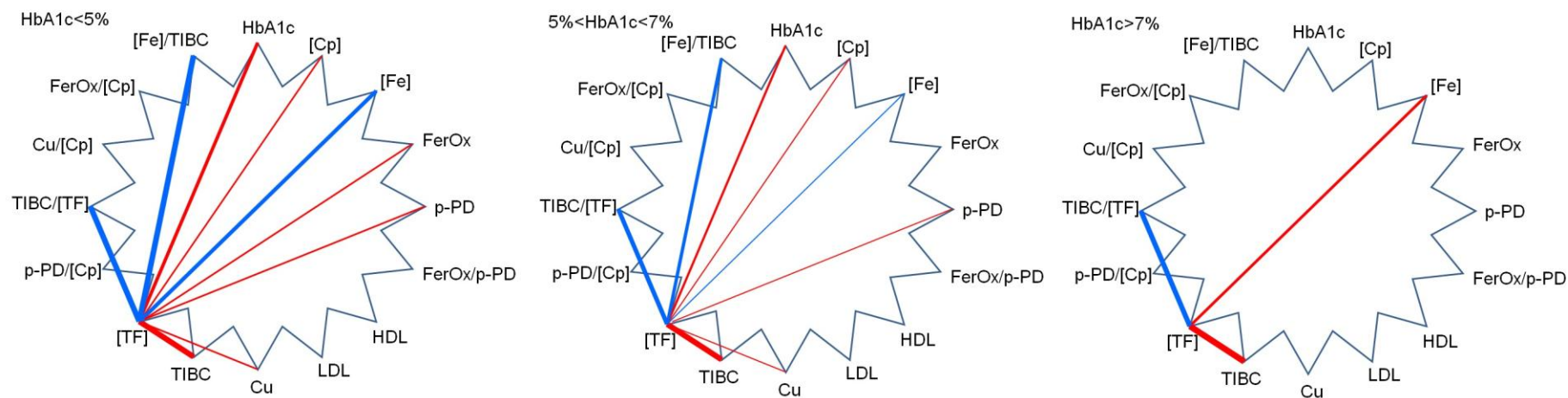


Рисунок 4-11. Круговая схема корреляционных связей между концентрацией Tf и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

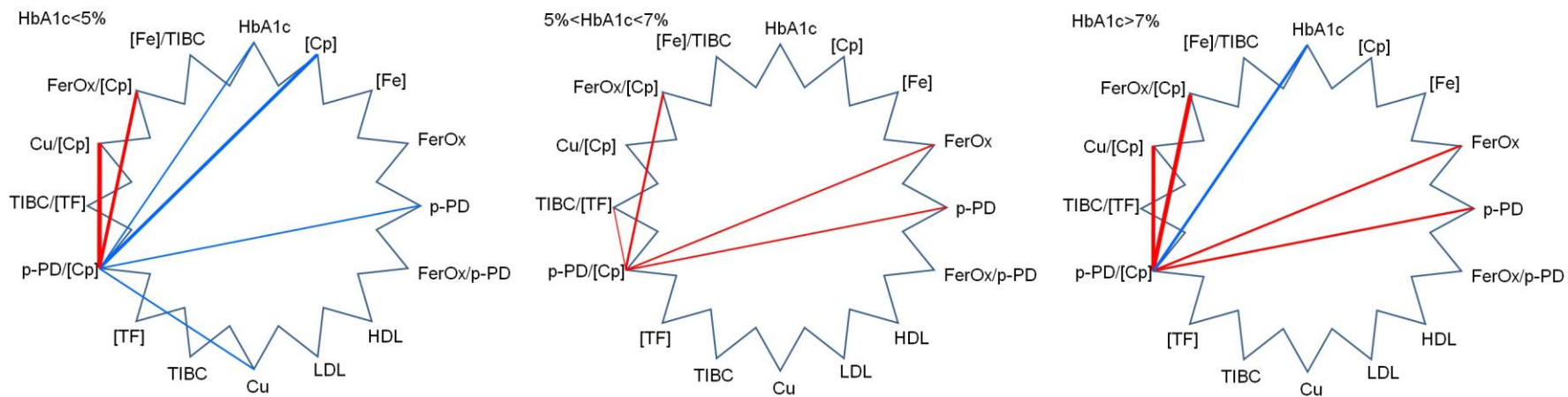


Рисунок 4-12. Круговая схема корреляционных связей между удельной активностью Ср в отношении p-PD и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

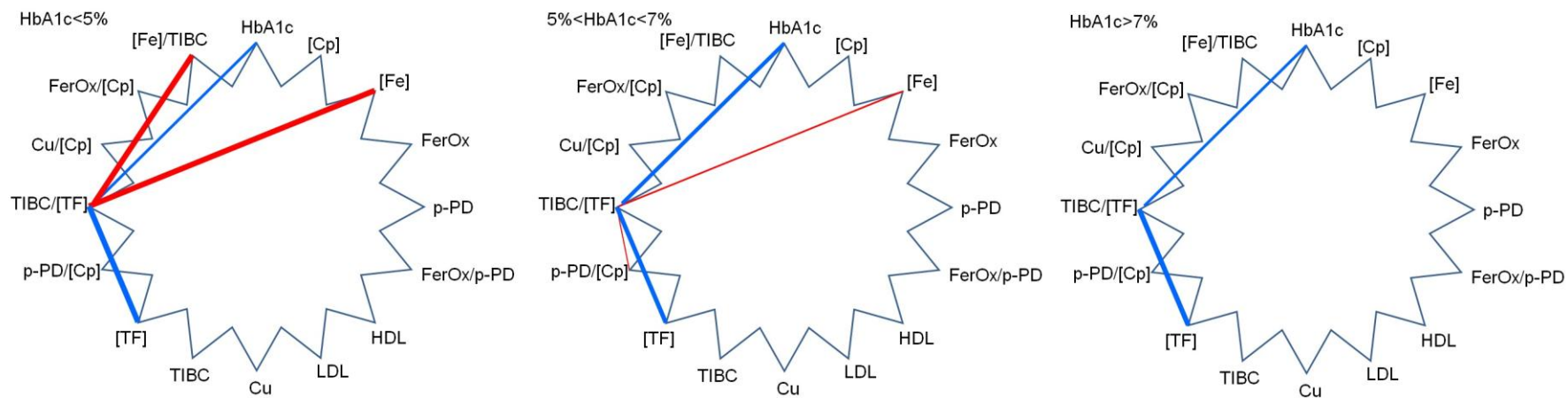


Рисунок 4-13. Круговая схема корреляционных связей между удельной активностью Tf (TIBC/[Tf]) и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

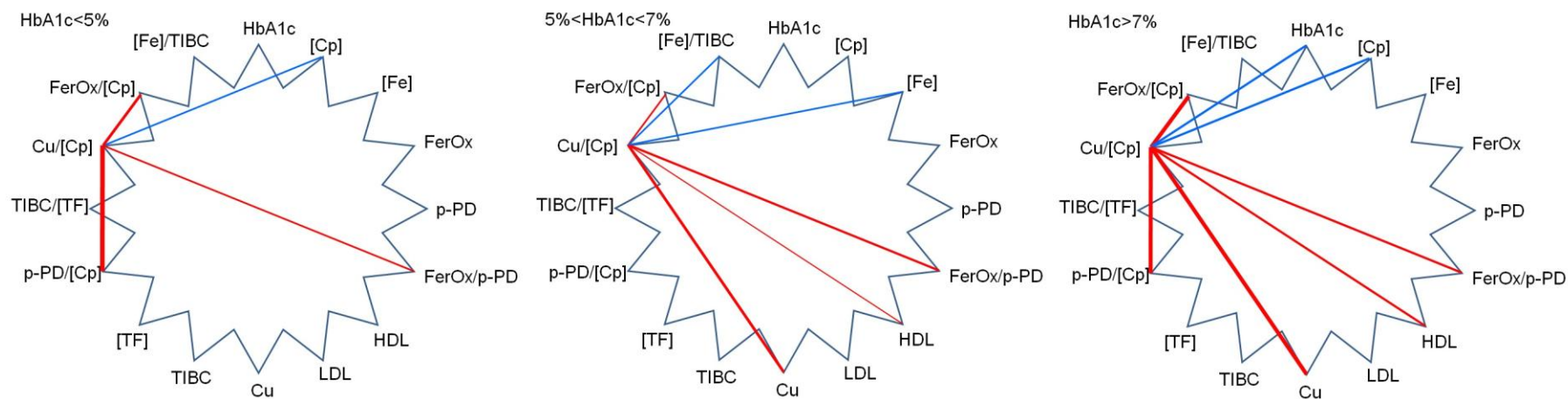


Рисунок 4-14. Круговая схема корреляционных связей между насыщением Ср ионами меди и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

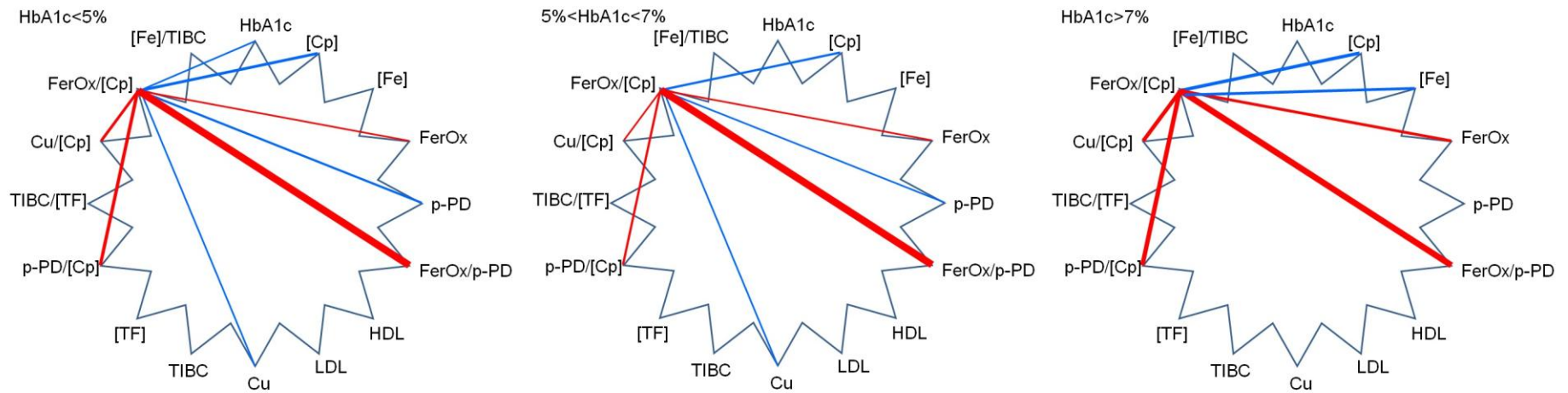


Рисунок 4-15. Круговая схема корреляционных связей между удельной ферроксидазной активностью Ср и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

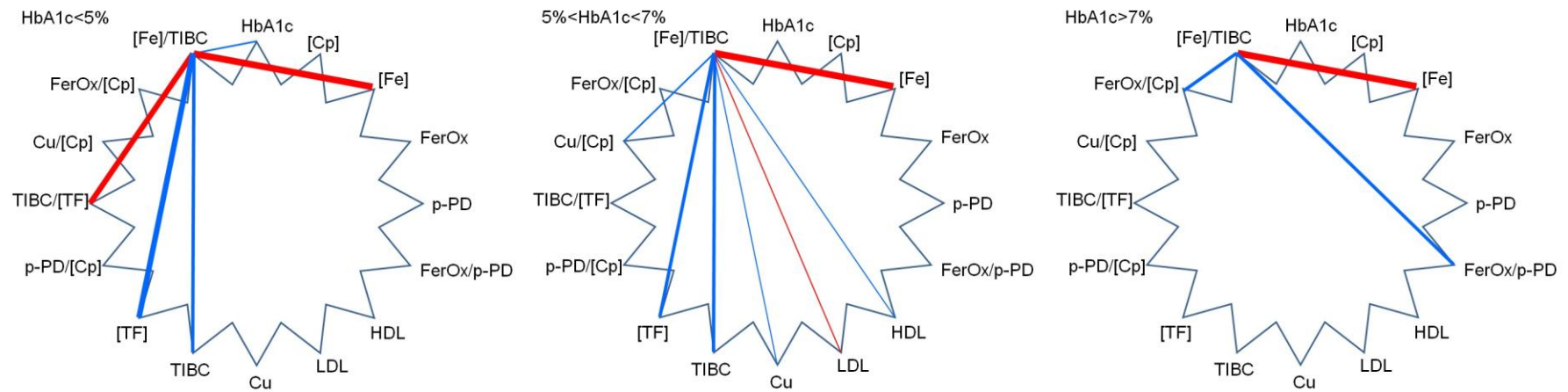


Рисунок 4-16. Круговая схема корреляционных связей между отношением концентрации железа к общей железосвязывающей способности сыворотки крови ($[Fe]/TIBC$) и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)

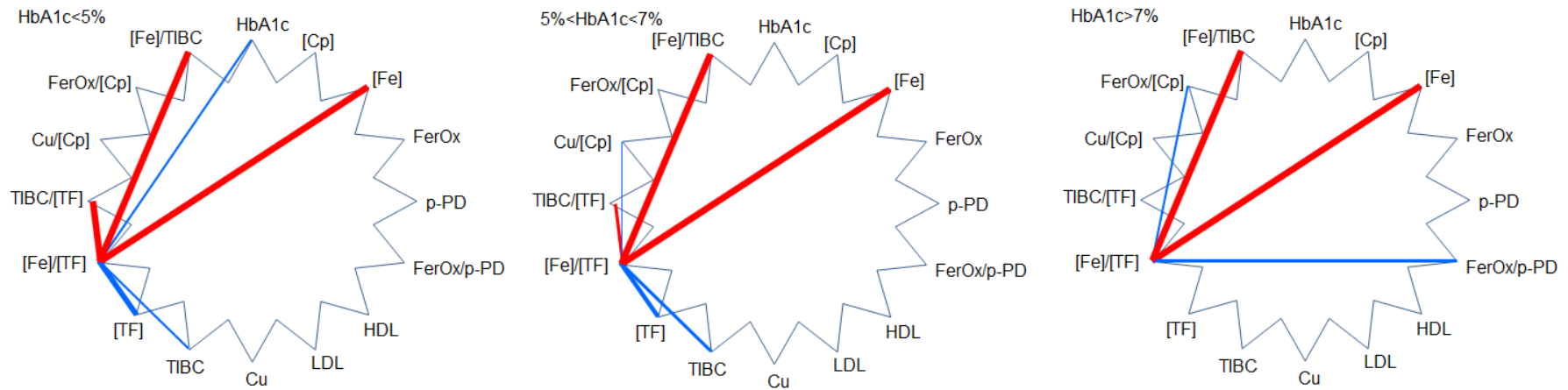


Рисунок 4-17. Круговая схема корреляционных связей между отношением концентрации железа к концентрации трансферрина ($[Fe]/[Tf]$) и различными биохимическими показателями в группах 1,2 и 3, (пояснения в тексте)