

УДК 616.379-008.64+577.128
<https://doi.org/10.17816/MAJ19088>

АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИИ И АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОБМЕНЕ ЖЕЛЕЗА, У КРЫС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ

И.В. Войнова¹, В.А. Костевич¹, А.Ю. Елизарова¹, М.Н. Карпенко¹, А.В. Соколов^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Войнова И.В., Костевич В.А., Елизарова А.Ю., и др. Анализ концентрации и активности белков, участвующих в обмене железа, у крыс при гипергликемии, индуцированной стрептозотоцином // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 4. – С. 93–102. <https://doi.org/10.17816/MAJ19088>

Поступила: 11.10.2019

Одобрена: 19.11.2019

Принята: 27.11.2019

Цель — провести анализ изменений концентрации и активности белков, которые участвуют в обмене железа, при моделировании у крыс гипергликемии, вызванной стрептозотоцином.

Материалы и методы. Измерены концентрация и активность трансферрина и церулоплазмينا, концентрация глюкозы, фруктозамина, гемоглобина, ферритина, железа в образцах крови крыс после инъекции стрептозотоцина и у животных, которым вводили натрий-фосфатный буфер. Для отработки условий иммуноферментного анализа были получены высокоочищенные препараты церулоплазмينا, трансферрина и ферритина, а также антитела к ним.

Результаты. Развитие гипергликемии у крыс после инъекции стрептозотоцина подтверждено увеличением концентрации глюкозы и фруктозамина в крови. Обнаружено повышение концентрации церулоплазмينا и снижение его удельной ферроксидазной активности, а также снижение концентрации трансферрина и ферритина у крыс с гипергликемией. Однако отсутствие различий в концентрации железа и железосвязывающей способности сыворотки крови между группами животных свидетельствует о компенсаторной реакции.

Заключение. Вызванная с помощью стрептозотоцина гипергликемия у крыс характеризуется изменениями активности и концентрации белков, участвующих в обмене железа, однако следует отметить, что гомеостатическая реакция нивелирует выявленные изменения. Изменения концентрации церулоплазмينا и трансферрина сопоставимы с таковыми при острой фазе воспаления.

Ключевые слова: сахарный диабет; гипергликемия; железо; гемоглобин; трансферрин; ферритин; церулоплазмин; ферроксидазная активность; крысы; стрептозотоцин.

ANALYSIS OF CONCENTRATION AND ACTIVITY OF PROTEINS INVOLVED IN IRON METABOLISM IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED HYPERGLYCEMIA

I.V. Voynova¹, V.A. Kostevich¹, A.Yu. Elizarova¹, M.N. Karpenko¹, A.V. Sokolov^{1,2}

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Voynova IV, Kostevich VA, Elizarova AYU, et al. Analysis of concentration and activity of proteins involved in iron metabolism in rats with streptozotocin-induced hyperglycemia. *Medical Academic Journal*. 2019;19(4):93-102. <https://doi.org/10.17816/MAJ19088>

Received: October 11, 2019

Revised: November 19, 2019

Accepted: November 27, 2019

Objective. We aimed to analyze the alterations of concentration and activity of iron metabolism proteins in samples obtained from rats with hyperglycemia induced by streptozotocin (STZ).

Materials and methods. Concentration and activity of ceruloplasmin (Cp) and transferrin (Tf), concentration of glucose, fructosamine, hemoglobin, ferritin (Ft), and iron were measured in blood samples obtained from rats after injection of STZ or saline (control). To develop in-house ELISA, highly purified preparations of Cp, Tf, and Ft, as well as specific antibodies against these proteins, were obtained.

Results. The hyperglycemia in rats after STZ injection was confirmed by increase in glucose and fructosamine serum concentrations. Increase in Cp concentration and decrease in specific ferroxidase activity of Cp, concentration of Tf and Ft were observed in hyperglycemic rats. However, the absence of changes in iron concentration and total iron binding capacity of serum is indicative of compensatory response.

Conclusion. STZ-induced hyperglycemia in rats was characterized by alteration of activity and concentration of iron metabolism proteins, however, this alteration was negated by homeostatic response. The alterations of Cp and Tf concentrations observed in this study are similar to those in acute phase of inflammation.

Keywords: diabetes mellitus; hyperglycemia; iron; hemoglobin; transferrin; ferritin; ceruloplasmin; ferroxidase activity; rats; streptozotocin.

Список сокращений

Cp — церулоплазмин; FerOx — ферроксидазная активность; Ft — ферритин; Hb — гемоглобин; PBS — натрий-фосфатный буфер (от англ. phosphate-buffered saline); p-PD — пара-фенилендиамин-оксидазная активность; STZ — стрептозотоцин; Tf — трансферрин; TIBC — общая железосвязывающая способность (сыворотки крови).

Введение

Вследствие хронической гипергликемии сахарный диабет (лат. *diabetes mellitus*) сопровождается развитием так называемого карбонильного стресса — хронического увеличения концентрации карбонильных соединений, образующихся при неферментативном окислении глюкозы [1]. Сахарный диабет 2-го типа сопутствует такому тяжелому состоянию, как метаболический синдром. Численность людей, пораженных этим состоянием, прогрессивно увеличивается в развитых странах [2]. Классическим биохимическим маркером выраженности хронической гипергликемии является гликированный гемоглобин, однако модификации глюкозой и продуктами ее окисления подвергаются и другие циркулирующие в крови белки, а также липопротеины [1, 3]. При модификации биополимеры утрачивают нормальные функции и становятся активаторами воспаления, которое в свою очередь сопровождается развитием окислительного стресса [4]. Защита от окислительного стресса реализуется за счет антиоксидантных систем организма, среди которых выделяют систему церулоплазмينا (Ср) и трансферрина (Тф) [5]. Церулоплазмин и трансферрин участвуют в гомеостазе железа за счет наличия ферроксидазной активности (FeOx) и способности транспортировать железо к клеткам соответственно [6]. Несмотря на тесную функциональную взаимосвязь, данные белки не образуют стабильного комплекса [7]. Однако в ряде работ показано, что при сахарном диабете происходит модификация как Ср, так и Тф [8–11]. Модификация Ср и Тф в свою очередь может привести к нарушениям нормального оттока железа из тканей, что обуславливает развитие таких осложнений сахарного диабета, как трофические язвы, поражающие, в частности, нижние конечности. В запущенных случаях диабетическая стопа заканчивается ампутацией [12].

С целью поиска лекарственных средств, которые могли бы повлиять на патогенетические звенья сахарного диабета, часто используют различные модели данной патологии у животных. Одной из наиболее часто применяемых моделей сахарного диабета у крыс является вызванное стрептозотоцином (STZ) поражение бета-клеток поджелудочной железы [13]. Учитывая снижение активности Ср и Тф при сахарном диабете у пациентов [8–11], а также данные о том, что дефицит меди увеличивает смертность животных при гипергликемии [14], мы решили использовать STZ при разработке подходов коррекции активности участников обмена железа. Однако даже поверхностный

анализ литературы об изменениях концентрации и/или активности Ср и Тф у крыс после введения STZ свидетельствует о противоречивости данных. Например, в двух исследованиях после инъекции STZ крысам линии Спрег-Доули концентрация Ср и его оксидазная активность в плазме крови не изменялись [15, 16], а в других исследованиях, выполненных на той же линии крыс, активность Ср лишь немного снизилась после введения STZ [17] либо снизилась в 2 раза [18]. При этом в более поздней работе показано, что активность Ср значительно возросла после инъекции STZ [19]. Вывод об увеличении концентрации Ср был подтвержден с помощью метода двухмерного электрофореза, в этой работе было также выявлено увеличение концентрации Тф [20]. Следует отметить, что дозы STZ, которые получали крысы, в упомянутых выше исследованиях были весьма близки. У крыс Вистар в пяти исследованиях обнаружено значительное увеличение концентрации либо активности Ср после инъекции STZ [21–25]. Однако в другом исследовании на крысах Вистар отмечено значительное снижение оксидазной активности Ср после введения STZ [26]. Наконец, в двух исследованиях было показано снижение концентрации железа и насыщения Тф железом после STZ-индуцированной гипергликемии [27, 28]. Столь противоречивые результаты исследований в случае Ср можно объяснить множественными механизмами регуляции экспрессии его гена, в которой принимают участие эстрогены [29], провоспалительные цитокины и тромбин [30, 31], избыток меди [32], дефицит железа и гипоксия [33] и, наконец, инсулин [34].

Поскольку существует функциональная взаимосвязь между ферроксидазной активностью Ср и насыщением Тф железом, целью данного исследования было сравнение концентрации и активности Ср и Тф, а также концентрации железа и ферритина (Ft) у крыс с вызванной STZ гипергликемией и у животных контрольной группы.

Материалы и методы

До проведения эксперимента по моделированию состояния гипергликемии были отработаны аналитические методы определения концентрации Ср, Тф и Ft у крыс, а также оптимизированы условия определения активности Ср и Тф. Сыворотку крови крыс для выделения высокоочищенных препаратов Ср и Тф, а также печень получали от интактных животных, наркотизированных диэтиловым эфиром. Церулоплазмин очищали с помощью ионооб-

менной хроматографии сыворотки крови на колонке со смолой UNOsphere Q и аффинной хроматографии на колонке с неомицин-агарозой [35]. Следы тромбина дополнительно удаляли из препарата с помощью фильтрации через колонку с бензамидин-агарозой [36]. Из 500 мл сыворотки крови было получено 260 мг препарата Ср, критерий чистоты которого (A_{610}/A_{280}) равнялся 0,054, что соответствовало гомогенному Ср крысы [37]. Церулоплазмин концентрировали до объема 5 мл и хранили аликвотами по 0,2 мл при -80°C . Сыворотку крови, прошедшую через колонку с UNOsphere Q, использовали для выделения Tf: белок насыщали железом(III), высаливали при 70 % насыщении сульфатом аммония и после диализа растворенного осадка Tf очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонках с DEAE-Toyopearl и UNOsphere S, используя для элюции Tf линейный градиент концентрации NaCl [38]. Из 500 мл сыворотки крови было получено 1890 мг гомогенного препарата Tf, который был представлен единичной 78-кДа зоной по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии детергентов. Трансферрин концентрировали до объема 94,5 мл и хранили аликвотами по 1,5 мл при -80°C . Для очистки Ft использовали 100 г печени крыс, ткань измельчали ножницами и промывали водой, затем гомогенизировали в двух объемах воды. Гомогенат быстро нагревали на водяной бане до 70°C при непрерывном перемешивании в течение 5 мин, сразу же охлаждали до 4°C на льду и центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин при 4°C для осаждения денатурированного белка. Содержащую Ft надосадочную жидкость насыщали до 50 % сульфатом аммония. Осадок Ft ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере (PBS — phosphate-buffered saline), диализовали против PBS и центрифугировали при 4°C при 30 000 g в течение получаса, надосадочную жидкость центрифугировали при 4°C при 100 000 g в течение 2 ч. Полученный осадок Ft ресуспендировали в PBS и наносили на уравновешенную PBS колонку с BioGel-1,5m. Элюированный в свободном объеме пик Ft (оранжевого цвета) концентрировали и повторяли гель-фильтрацию. Для определения концентрации Ft, полученного с помощью данного метода [39], использовали коэффициент экстинкции: $\epsilon_{380} = 20,9$ мл/мг на сантиметр [40].

С целью подготовки антигенов для иммунизации полученные ранее препараты белков подвергали диск-электрофорезу в полиакриламидном геле без детергентов [41], нанося по 600 мкг на отдельные гели. После разделения вырезали скальпелем окрашенные в голубой,

красный и оранжевый цвета полосы геля, которые соответствовали Ср, Tf и Ft, полосы делили на три части и хранили при -20°C до иммунизации кроликов. Перед иммунизацией гель гомогенизировали в 3–4 объемах PBS до возможности прохождения суспензии через иглу шприца и добавляли для первой иммунизации $1/10$ объема полного, а для двух последующих — неполного адьюванта Фрейнда. Суспензии вводили кроликам внутривенно в паравертебральную область с интервалом 2 нед., по два кролика на один антиген (около 100 мкг на одну иммунизацию животного). Через 7 дней после третьей иммунизации у животных собирали кровь из ушной вены и из сыворотки получали аффинные антитела. Сорбенты для иммуноаффинной очистки антител получали с помощью иммобилизации белковых антигенов на BrCN-активированной агарозе: примерно 5–10 мг белка на 1 мл влажного геля [42]. Аффинные антитела, элюированные с сорбентов с помощью 0,2 М глицин-HCl (pH 2,6), нейтрализовали при сборе фракций, диализовали против PBS и часть использовали для конъюгации с пероксидазой из корней хрена с помощью периодата [43].

Для твердофазного иммуноферментного анализа концентрации Ср, Tf либо Ft применяли сэндвич-вариант метода [44]. Аффинные антитела (5 мкг/мл) вносили в лунки 96-луночных полистирольных планшетов с высокой сорбционной способностью. После каждой стадии (кроме выявления активности пероксидазной метки) лунки планшета промывали PBS с добавлением 0,05 % Tween 20 с помощью прибора PW-40 (Bio-Rad) и инкубировали при перемешивании со скоростью 270 об/мин при 37°C в термошейкере PST-60HL-4 (BioSan). Блокировали лунки 3 % раствором белков молока в PBS с добавлением 0,05 % Tween 20 в течение 1 ч, затем на 1 ч вносили анализируемые образцы (10 % объема или менее) и стандартные растворы очищенных Ср, Tf или Ft (0–50 нг/мл), на 1 ч вносили меченные пероксидазой аффинные антитела (разведение конъюгата 2 мкг/мл составляло 1 : 5000 или менее) и после этого для выявления активности пероксидазы вносили раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с пероксидом водорода. Когда через 5–20 мин появлялась окраска, реакцию останавливали 1 М H_2SO_4 и измеряли поглощение в лунках с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG Labtech) при 450 нм. При помощи программного обеспечения Mars вычисляли концентрацию белков в образцах с учетом их разбавления, сравнивая их поглощение с градуировочным графиком, полученным для стандартов Ср, Tf либо Ft.

Ферроксидазную активность Ср определяли с применением адаптированного для биохимического анализатора BS-200 (Mindray, Китай) метода, основанного на измерении концентрации Fe(II) путем добавления хромогена (феррозина) после инкубации с образцом сыворотки крови [45]. 1 Е соответствует количеству фермента (Ср) в сыворотке крови, который окисляет 1 мкМ Fe(II) за минуту в 450 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 5,8), содержащем 367 мкМ Fe(II) (соль Мора).

Пара-фенилендиамин-оксидазную активность (р-PD) Ср определяли микрометодом [46], адаптированным для исследования образцов сыворотки крови крыс. В лунки 96-луночного планшета вносили по 10 мкл проб или стандартных растворов, содержащих 0–1,2 мг/мл Ср крысы, во все лунки добавляли по 200 мкл 0,2 % пара-фенилендиамина дигидрохлорида в 0,4 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,5). Через 30 мин реакцию останавливали, внося в лунки по 40 мкл 0,5 % азида натрия (ингибитор активности Ср). Измеряли поглощение проб при 530 нм с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG Labtech). С применением программного обеспечения MagS строили градуировочную прямую, по которой автоматически вычисляли содержание Ср в образцах сыворотки.

Концентрацию железа в сыворотке крови определяли с помощью 2-(5-нитро-2-пиридазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропиламино)-фенола с добавлением тиогликолевой кислоты для маскировки меди и цинка [47]. Общую железосвязывающую способность сыворотки (ТIBC) оценивали путем добавления 10 мкл 4,5 мМ FeCl₃ к 250 мкл сыворотки и последующего удаления избытка железа через 10 мин инкубации с помощью добавки 20 мг MgCO₃. Для определения железа [47] использовали надосадочную жидкость, полученную после удаления MgCO₃ в процессе центрифугирования в течение 15 мин при 3000 г.

Концентрацию гемоглобина (Hb) определяли спектрофотометрически после превращения Hb в цианметгемоглобин под действием феррицианида и цианида калия [48]. Концентрацию глюкозы вычисляли с использованием набора «ГЛЮКОЗА-ВИТАЛ» (АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия): окисление глюкозы глюкозооксидазой и сопряженная хромогенная реакция пероксида водорода, катализируемая пероксидазой из корней хрена. Концентрацию фруктозамина в образцах сыворотки крови определяли по реакции восстановления нитротетразолия синего в щелочной среде с применением стандарта фруктозамина для построения градуировочной прямой [49].

Для характеристики удельной активности Ср и Tf использовали отношение FerOx либо р-PD к концентрации Ср и отношение ТIBC к концентрации Tf соответственно. Молярную концентрацию белков вычисляли, принимая молярную массу Ср и Tf за 132 000 и 78 000 г/моль соответственно.

Эксперименты выполнены на 16 крысах-самцах Вистар массой 120–150 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ ИЭМ (№ 2/19 от 25.03.2019). 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. При достижении возраста 5 недель у всех животных оценивали активность Ср (р-PD) с целью исключения из опыта особей с острой фазой воспаления. После рандомизированного разделения на две группы крысам контрольной группы ($n = 8$) под эфирным наркозом вводили стерильный PBS, а для моделирования гипергликемии крысам ($n = 8$) внутривентриально вводили раствор STZ из расчета 43 мг/кг массы тела. Через 5 нед. у всех животных собирали кровь под эфирным наркозом, убирая корм за 10 ч до забора крови. Аликвоту цельной крови использовали для анализа Hb, а из оставшейся крови изготавливали образцы сыворотки крови с целью определения остальных биохимических параметров, характеризующих обмен железа и гипергликемию.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica (версия 10.0). Результаты представляли в виде медианы (Me), нижнего (Q_1) и верхнего (Q_2) квартилей; для выявления различий между двумя несвязанными группами применяли U -критерий Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В таблице представлены данные о значениях Me , Q_1 , Q_2 и p для биохимических параметров, определенных в образцах сыворотки крови (цельной крови для Hb), полученных от животных обеих групп. Для подтверждения того, что изменения обмена железа не вызваны случайными ошибками при рандомизации животных, измеряли концентрацию Hb, которая не отличалась у животных контрольной группы и при моделировании сахарного диабета (рис. 1, а). Доказательством развития гипергликемии служило увеличение в крови концен-

Биохимические показатели и значимость их различий в контрольной группе крыс и группе крыс, получивших инъекцию стрептозотоцина

Biochemical variables and significance of differences thereof in rats of control group and the rats given injection of STZ

Показатель	Me (Q ₁ –Q ₂)		Уровень значимости, p
	Контроль (n = 8)	STZ (n = 8)	
Гемоглобин, г/л	123,6 (117,5–128,8)	124,7 (120,0–132,6)	NS
Глюкоза, mM	8,3 (7,0–9,0)	40,0 (36,1–42,5)	0,000
Фруктозамин, mM	1,0 (0,9–1,0)	1,2 (1,2–1,3)	0,001
Ферроксидазная активность церулоплазмина, Е/л	806,8 (715,6–872,2)	822,1 (770,0–854,4)	NS
Пара-фенилендиамин-оксидазная активность, мкМ	7,0 (6,3–8,2)	7,3 (6,8–8,0)	NS
Церулоплазмин, мкМ	6,6 (5,9–8,0)	8,9 (8,7–9,5)	0,001
FerOx/Ср, Е/мкмоль	117,1 (113,7–123,2)	9,2 (88,6–95,0)	0,000
p-PD/Ср, моль/моль	1,0 (1,0–1,1)	0,8 (0,8–0,8)	0,000
Железо, мкМ	39,8 (34,9–47,0)	46,3 (44,0–52,9)	NS
Общая железосвязывающая способность, мкМ	95,7 (87,3–108,1)	85,2 (82,3–92,0)	NS
Трансферрин, мкМ	69,1 (63,1–83,0)	53,7 (47,1–61,5)	0,0499
TIBC/Tf, моль/моль	1,2 (1,1–1,8)	1,7 (1,4–1,9)	NS
Ферритин, нг/мл	19,5 (17,8–21,5)	15,5 (14,8–16,5)	0,028

Примечание. NS — уровень значимости выше критического; 0,000 — значащая цифра находится дальше 3-го разряда после целого. Условные обозначения, использованные в таблице, см. в списке сокращений.

трации глюкозы и фруктозамина (рис. 1, *b* и *c*, $p = 0,000$ и $p = 0,001$).

Интересно, что при отсутствии различий между группами в FerOx и p-PD активности Ср (рис. 2, *a* и *b*) было обнаружено повышение концентрации Ср в группе крыс с STZ-индуцированной гипергликемией (рис. 2, *c*, $p = 0,001$), в то время как удель-

ные FerOx и p-PD активности Ср снизились (рис. 2, *d* и *e*, $p = 0,0003$ и $p = 0,0003$ соответственно). В отличие от Ср концентрация Tf и Ft снизилась (рис. 3, *a* и *b*, $p = 0,0499$ и $p = 0,028$ соответственно). Не было выявлено изменений концентрации Fe и TIBC (рис. 3, *c* и *d*), что согласуется с данными, полученными ранее при исследовании этих параметров у условно

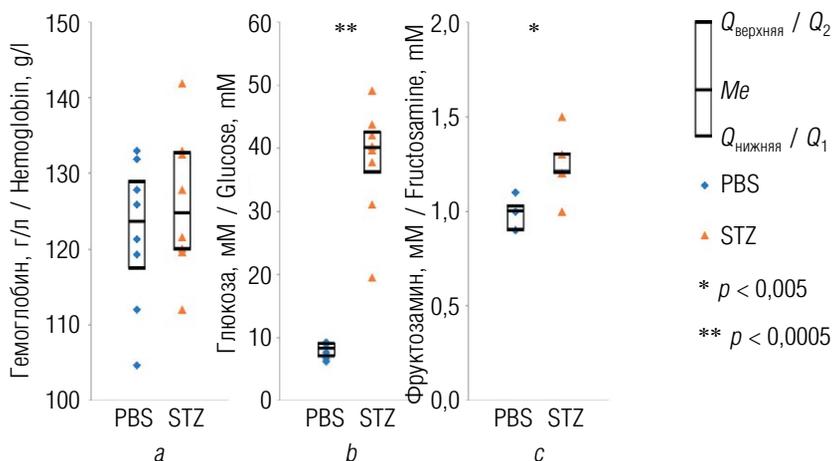


Рис. 1. Концентрация гемоглобина (*a*), глюкозы (*b*) и фруктозамина (*c*) в крови крыс контрольной группы (PBS) и крыс, получивших стрептозотоцин (STZ)

Fig. 1. Concentration of hemoglobin (*a*), glucose (*b*), and fructosamine (*c*) in blood of control group rats (PBS) and STZ-injected rats (STZ)

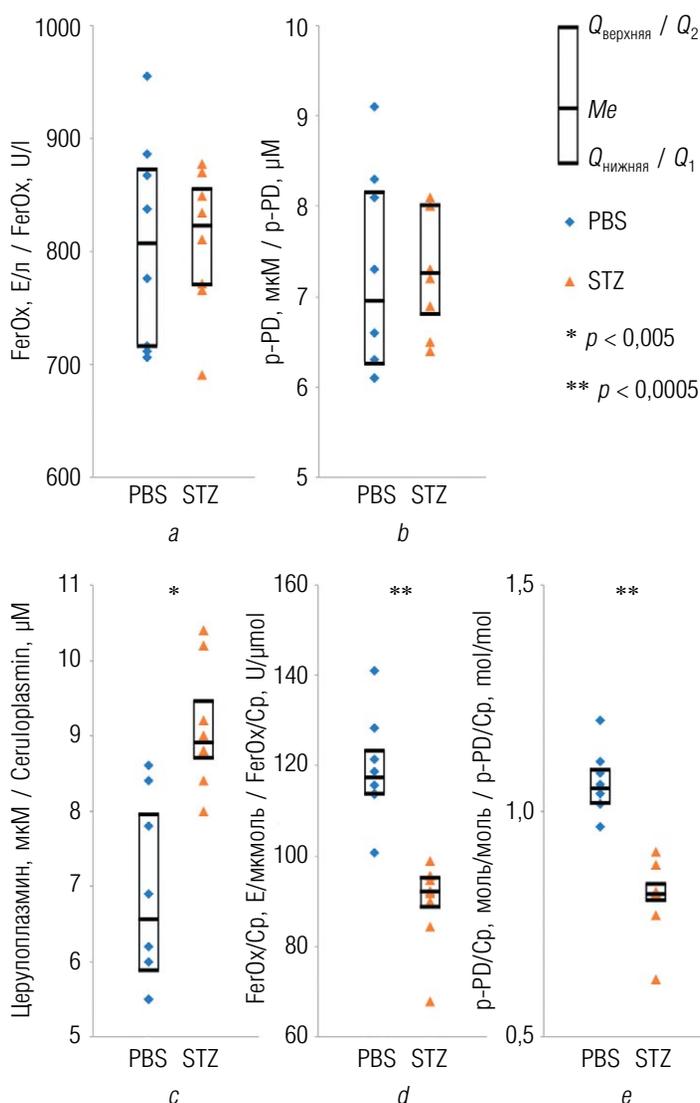


Рис. 2. Ферроксидазная активность (FerOx) (a), пара-фенилендиамин-оксидазная активность (p-PD) (b), концентрация церулоплазмينا (c), удельные FerOx (FerOx/Ср) (d) и p-PD церулоплазмина (p-PD/Ср) (e) у крыс контрольной группы (PBS) и крыс, получивших стрептозотоцин (STZ)

Fig. 2. Ferroxidase activity (FerOx) (a), para-phenylenediamine-oxidase activity (p-PD) (b), concentration of ceruloplasmin (c), specific FerOx (FerOx/Cp) (d), and specific p-PD of ceruloplasmin (p-PD/Cp) (e) in control group rats (PBS) and STZ-injected rats (STZ)

здоровых доноров и пациентов с сахарным диабетом 2-го типа [11]. Однако, несмотря на развитие гипергликемии, удельная активность Tf у крыс не изменилась (рис. 3, e).

Ранее мы обнаружили достоверное снижение удельной активности Tf у пациентов с некомпенсированным сахарным диабетом [11]. Такие различия можно объяснить большими компенсаторными возможностями антиоксидантной системы у крыс, признаком которых, в частности, является выявленное нами увеличение концентрации Ср, которое нивелирует снижение удельных активностей Ср, что в свою очередь может компенсировать снижение концентрации Tf. Например, недавно было показано, что удельная супероксиддисмутаза-

ная активность Ср крыс превышает таковую у человека за счет наличия дополнительного сайта для связывания иона меди в Ср крысы [37]. Поскольку Ср до определенной степени способен подавлять респираторный взрыв нейтрофилов за счет наличия у него супероксиддисмутазной активности [46], можно предположить, что у крыс данный механизм защиты от окислительного стресса, ассоциированного с воспалением, выражен сильнее. Не исключено, что обнаруженные разнонаправленные изменения концентрации Ср и Tf могут отражать развитие воспаления, характерного для STZ-модели [50]. Недавно было установлено, что STZ-индуцированная гипергликемия сопровождается увеличением активности фермен-

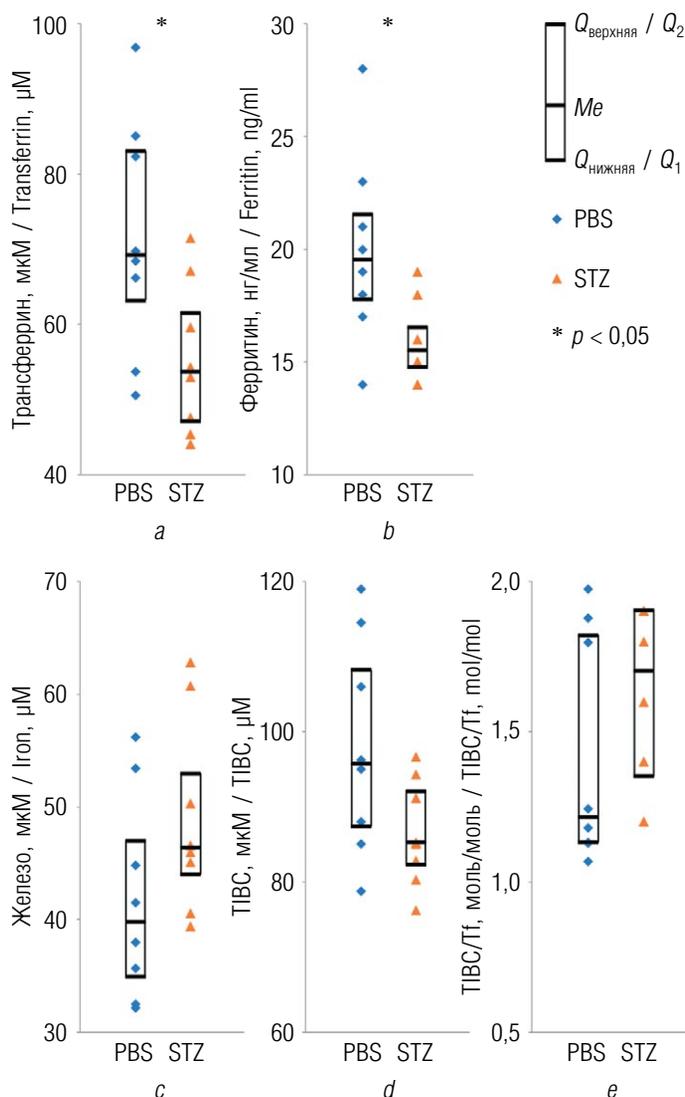


Рис. 3. Концентрация трансферрина (а), ферритина (б), железа (с), общая железосвязывающая способность сыворотки (ТИВС) (д) и удельная активность трансферрина (ТИВС/Тf) (е) у крыс контрольной группы (PBS) и крыс, получивших стрептозотозин (STZ)

Fig. 3. Concentration of transferrin (a), ferritin (b), iron (c), total iron-binding capacity of serum (TIBC) (d), and specific activity of transferrin (TIBC/Tf) (e) in control group rats (PBS) and STZ-injected rats (STZ)

та нейтрофильных лейкоцитов миелопероксидазы, которая коррелировала с концентрацией карбонильных групп в белках [50]. Стоит также отметить, что наследственный дефицит Ср (ацерулоплазминемия) у человека практически всегда сопровождается развитием сахарного диабета 2-го типа [51], а у грызунов такое состояние обусловлено только двойным нокаутированием генов Ср и гефестина, связанного с клеточной мембраной гомолога Ср [52].

Заключение

При сравнении биохимических параметров, характеризующих обмен железа, у крыс Вистар, подвергнутых STZ-индуцированной гипергликемии, мы обнаружили повышение концентрации

церулоплазмينا и снижение его удельной ферроксидазной активности, а также снижение концентрации трансферрина и ферритина. Такие изменения концентрации церулоплазмينا и трансферрина характерны для острой фазы воспаления.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ МК-5874.2018.4 и МД-5133.2018.4.

Соблюдение этических норм. Выполнение исследования одобрено протоколом локального этического комитета при ФГБНУ ИЭМ (№2/19, 25.03.2019).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Lankin VZ, Tikhaze AK, Kapel'ko VI, et al. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress. *Biokhimiia*. 2007;72(10):1081-1090. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100069>.
- Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2017;11(8):215-225. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>.
- Pandey R, Dingari NC, Spegazzini N, et al. Emerging trends in optical sensing of glycemic markers for diabetes monitoring. *Trends Analyt Chem*. 2015;64:100-108. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.09.005>.
- Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998;44(7):1013-1023.
- Horn RA, Friesen EJ, Stephens RL, et al. Electron spin resonance studies on properties of ceruloplasmin and transferrin in blood from normal human subjects and cancer patients. *Cancer*. 1979;43(6):2392-2398. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197906\)43:6<2392::aid-cncr2820430633>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197906)43:6<2392::aid-cncr2820430633>3.0.co;2-g).
- Osaki S, Johnson DA, Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem*. 1966;241(12):2746-2751.
- Sokolov AV, Voynova IV, Kostevich VA, et al. Comparison of interaction between ceruloplasmin and lactoferrin/transferrin: to bind or not to bind. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(9):1073-1078. <https://doi.org/10.1134/S0006297917090115>.
- Squitti R, Mendez AJ, Simonelli I, Ricordi C. Diabetes and Alzheimer's disease: can elevated free copper predict the risk of the disease? *J Alzheimers Dis*. 2017;56(3):1055-1064. <https://doi.org/10.3233/JAD-161033>.
- Golizeh M, Lee K, Ilchenko S, et al. Increased serotransferrin and ceruloplasmin turnover in diet-controlled patients with type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2017;113:461-469. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.373>.
- Silva AMN, Coimbra JTS, Castro MM, et al. Determining the glycation site specificity of human holo-transferrin. *J Inorg Biochem*. 2018;186:95-102. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.016>.
- Войнова И.В., Костевич В.А., Елизарова А.Ю., и др. Зависимость удельной активности участников обмена железа от степени компенсации сахарного диабета 2-го типа // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 2. – С. 37–42. [Voynova IV, Kostevich VA, Elizarova AY, et al. The specific activity of proteins involved in iron metabolism depends on compensation of type 2 diabetes mellitus. *Medical academic journal*. 2019;19(2):37-42. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/maj19237-42>.
- Misra G, Bhattar SK, Kumar A, et al. Iron profile and glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Sci (Basel)*. 2016;4(4). <https://doi.org/10.3390/medsci4040022>.
- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(2):60-64. <https://doi.org/10.1007/BF02913315>.
- Fields M, Ferretti RJ, Smith JC, Jr., Reiser S. Effect of copper deficiency on metabolism and mortality in rats fed sucrose or starch diets. *J Nutr*. 1983;113(7):1335-1345. <https://doi.org/10.1093/jn/113.7.1335>.
- Miller LL, Treat DE, Fridd B, Wemett D. Effects of streptozotocin diabetes in the rat on blood levels of ten specific plasma proteins and on their net biosynthesis by the isolated perfused liver. *Hepatology*. 1990;11(4):635-645. <https://doi.org/10.1002/hep.1840110417>.
- Oster MH, Llobet JM, Domingo JL, et al. Vanadium treatment of diabetic Sprague-Dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology*. 1993;83(1-3):115-130. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(93\)90096-b](https://doi.org/10.1016/0300-483x(93)90096-b).
- Asayama K, Nakane T, Uchida N, et al. Serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res*. 1994;26(7):313-315. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1001693>.
- Anwar MM, Meki A-RMA. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003;135(4):539-547. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00114-4).
- Uriu-Adams JY, Rucker RB, Commisso JF, Keen CL. Diabetes and dietary copper alter ⁶⁷Cu metabolism and oxidant defense in the rat. *J Nutr Biochem*. 2005;16(5):312-320. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.007>.
- Kim SW, Hwang HJ, Cho EJ, et al. Time-dependent plasma protein changes in streptozotocin-induced diabetic rats before and after fungal polysaccharide treatments. *J Proteome Res*. 2006;5(11):2966-2976. <https://doi.org/10.1021/pr0602601>.
- Venkateswaran S, Pari L, Saravanan G. Effect of Phaseolus vulgaris on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Med Food*. 2002;5(2):97-103. <https://doi.org/10.1089/109662002760178186>.
- Kamalakkannan N, Prince PSM. Hypoglycaemic effect of water extracts of Aegle marmelos fruits in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2003;87(2-3):207-210. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00148-x](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00148-x).
- Prakasam A, Sethupathy S, Pugalendi KV. Effect of Casearia esculenta root extract on blood glucose and plasma antioxidant status in streptozotocin diabetic rats. *Pol J Pharmacol*. 2003;55(1):43-49.
- Venkateswaran S, Pari L. Effect of Coccinia indica leaf extract on plasma antioxidants in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *Phytother Res*. 2003;17(6):605-608. <https://doi.org/10.1002/ptr.1195>.
- Babu PS, Stanely Mainzen Prince P. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of hyponid, an ayurvedic herbomineral formulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56(11):1435-1442. <https://doi.org/10.1211/0022357044607>.
- Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense sys-

- tem in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci*. 2004;75(22):2717-2731. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.005>.
27. Korkach lu P, Dudchenko NO, Kotsiuruba AV, et al. Role of non-haem iron in protecting effect of ecdysterone on development of streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Ukr Biokhim Zh*. 2008;80(1):46-51.
 28. Mascaro MB, Franca CM, Esquerdo KF, et al. Effects of dietary supplementation with agaricus sylvaticus schaeffer on glycemia and cholesterol after streptozotocin-induced diabetes in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:107629. <https://doi.org/10.1155/2014/107629>.
 29. Воронина О.В., Монахов Н.К. Индукция образования под влиянием эстрадиола полирибосомного комплекса, синтезирующего церулоплазмин у крыс // Биохимия. — 1980. — Т. 45. — № 6. — С. 1010–1016. [Voronina OV, Monakhov NK. Induktsiya obrazovaniya pod vliyaniem estradiola poliribosomnogo kompleksa, sinteziruyushchego tseruloplazmin u krysov. *Biokhimiia*. 1980;45(6):1010-1016. (In Russ.)]
 30. Gitlin JD. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *J Biol Chem*. 1988;263(13):6281-6287.
 31. Yang S, Hua Y, Nakamura T, et al. Up-regulation of brain ceruloplasmin in thrombin preconditioning. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;96:203-206. https://doi.org/10.1007/3-211-30714-1_44.
 32. Martin F, Linden T, Katschinski DM, et al. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*. 2005;105(12):4613-4619. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3980>.
 33. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21048-21054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000636200>.
 34. Seshadri V, Fox PL, Mukhopadhyay CK. Dual role of insulin in transcriptional regulation of the acute phase reactant ceruloplasmin. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27903-27911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203610200>.
 35. Sokolov AV, Kostevich VA, Romanico DN, et al. Two-stage method for purification of ceruloplasmin based on its interaction with neomycin. *Biokhimiia*. 2012;77(6):631-638. <https://doi.org/10.1134/S0006297912060107>.
 36. Sokolov AV, Acquasaliente L, Kostevich VA, et al. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis. *Free Radic Biol Med*. 2015;86:279-294. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.016>.
 37. Samygin VR, Sokolov AV, Bourenkov G, et al. Rat ceruloplasmin: a new labile copper binding site and zinc/copper mosaic. *Metalomics*. 2017;9(12):1828-1838. <https://doi.org/10.1039/c7mt00157f>.
 38. Kostevich VA, Sokolov AV, Kozlov SO, et al. Functional link between ferroxidase activity of ceruloplasmin and protective effect of apo-lactoferrin: studying rats kept on a silver chloride diet. *Biomaterials*. 2016;29(4):691-704. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9944-2>.
 39. Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3275-3280.
 40. May ME, Fish WW. The UV and visible spectral properties of ferritin. *Arch Biochem Biophys*. 1978;190(2):720-725. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90332-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90332-6).
 41. Davis BJ. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 1964;121:404-427. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>.
 42. Sokolov AV, Zakharova ET, Shavlovskii MM, Vasil'ev VB. Isolation of stable human ceruloplasmin and its interaction with salmon protamine. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2005;31(3):269-279. <https://doi.org/10.1007/s11171-005-0033-5>.
 43. Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. *Anal Biochem*. 1984;136(2):451-457. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90243-4).
 44. Gaastra W. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 1984;1:349-355. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:349>.
 45. Erel O. Automated measurement of serum ferroxidase activity. *Clin Chem*. 1998;44(11):2313-2319.
 46. Varfolomeeva EY, Semenova EV, Sokolov AV, et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic Res*. 2016;50(8):909-919. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1197395>.
 47. 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;38(7):1373-1375.
 48. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv Clin Chem*. 1965;8:141-187. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(08\)60414-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(08)60414-x).
 49. Фельдкорен Б.Н., Осипова Е.Н., Коцегуб Г.П., Рогозкин В.А. Исследование параметров метода гликозилированных белков сыворотки крови // Лабораторное дело. — 1988. — № 5. — С. 56–59. [Fel'dkoren BN, Osipova EN, Kotsegub GP, Rogozkin VA. Issledovanie parametrov metoda glikozilirovannykh belkov syvorotki krovi. *Lab Delo*. 1988;(5):56-59 (In Russ.)]
 50. Stocker P, Cassien M, Vidal N, et al. 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;170:119-127. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.102>.
 51. Yoshida K, Furihata K, Takeda S, et al. A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans. *Nat Genet*. 1995;9(3):267-272. <https://doi.org/10.1038/ng0395-267>.
 52. Zheng J, Chen M, Liu G, et al. Ablation of hephaestin and ceruloplasmin results in iron accumulation in adipocytes and type 2 diabetes. *FEBS Lett*. 2018;592(3):394-401. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12978>.

Сведения об авторах / Information about the authors

Ирина Витальевна Войнова — аспирант, научный сотрудник отдела молекулярной генетики, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: iravoynova@mail.ru.

Валерия Александровна Костевич — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-1405-1322>. SPIN-код: 2726-2921. E-mail: hfa-2005@yandex.ru.

Анна Юрьевна Елизарова — аспирант, научный сотрудник отдела молекулярной генетики, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. SPIN-код: 3059-4381. E-mail: anechka_v@list.ru.

Марина Николаевна Карпенко — канд. биол. наук, заведующая лабораторией нейрохимии Физиологического отдела им. И.П. Павлова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-1082-0059>. SPIN-код: 6098-2715. E-mail: mnkarpenko@mail.ru.

Алексей Викторович Соколов — д-р биол. наук, заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0001-9033-0537>; SPIN-код: 7427-7395. E-mail: biochemsokolov@gmail.com.

Irina V. Voynova — PhD student, Research fellow of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: iravoynova@mail.ru.

Valeria A. Kostevich — PhD (Biology), Senior Researcher of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-1405-1322>. SPIN-code: 2726-2921. E-mail: hfa-2005@yandex.ru.

Anna Yu. Elizarova — PhD student, Research fellow of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. SPIN-code: 3059-4381. E-mail: anechka_v@list.ru.

Marina N. Karpenko — PhD (Biology), Head of the Laboratory of Neurochemistry of The Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-1082-0059>. SPIN-code: 6098-2715. E-mail: mnkarpenko@mail.ru.

Alexey V. Sokolov — Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; Professor of Chair of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology at Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-9033-0537>. SPIN-code: 7427-7395. E-mail: biochemsokolov@gmail.com.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Алексей Викторович Соколов / Alexey V. Sokolov
E-mail: biochemsokolov@gmail.com