**Ферритин как маркер железодефицитной анемии и опухолевый маркер**

Андреев Г. И. магистр техники и технологии, выпускник (2003 г.) СПбГПУ, факультет медицинской физики и биоинженерии, кафедра физико-химических основ медицины.

Железодефицитной анемией (ЖДА) и скрытыми формами дефицита железа страдает 50-80% населения России. Определение концентрации ферритина в сыворотке крови позволяет эффективно дифференцировать ЖДА от других типов анемий. Высокие концентрации ферритина характерны для воспалительных и инфекционных процессов, некоторых онкологических заболеваний.

В статье описаны структура и функции ферритина, его роль в метаболизме железа, характерные для разных состояний изменения его концентрации в крови, дан сравнительный анализ характеристик ИФА-наборов зарубежных производителей и первой российской тест-системы.

Ferritin as a marker of iron-deficiency anemia and oncomarker.

Andreev G. I. (egor67@mail.ru), magister of technology (2003), Saint Petersburg State Polytechnic University.

Key words: iron metabolism, ferritin, iron-deficiency anemia, oncomarkers, enzyme immunoassay.

There are 50-80% of population of Russia are suffering from iron-deficiency (IDA) and latent forms of iron deficiency. Determination of ferritin concentration in serum allows to differentiate efficiently IDA from other forms of anemia. High ferritin levels may be associated with inflammation and infectious diseases, certain malignancies.

The article describes structure and functions of ferritin, its role in iron metabolism, changes of its serum concentration, corresponding to different physiological states. The comparison of characteristics of the first Russian EIA kit and some foreign ones is given.

**Введение**

Ионы железа выполняют в организме человека очень важную функцию. Они входят в состав белков, осуществляющих перенос кислорода, цитохромов и железосеропротеинов, железосодержащих ферментов. Поэтому недостаток железа в организме приводит ко многим негативным последствиям. Одним из них является развитие железодефицитной анемии (ЖДА). Согласно данным ВОЗ, от скрытого дефицита железа и ЖДА страдает около одной трети населения планеты. В некоторых регионах России этот показатель достигает 70-80%. Проявления данного заболевания разнообразны и иногда приводят к тяжелым последствиям.

Избыточное содержание железа в организме также опасно. Оно приводит к развитию токсикозов, патологическому повышению уровня активных форм кислорода.

Вследствие этого важно иметь интегральный показатель оценки содержания железа в организме. Высокоинформативным маркером, характеризующим метаболизм железа, является ферритин.

Для определения содержания ферритина в сыворотке крови используются иммунометрические методы. В связи с поливалентностью данного антигена можно создать специфические и высокочувствительные системы определения его концентрации. В России в настоящее время определение ферритина в лабораторной практике распространено очень слабо. Это объясняется недостаточной информированностью населения и медицинского персонала о диагностической значимости данного показателя, а также сравнительно высокой стоимостью проведения анализа при помощи наборов реагентов зарубежных производителей. Первая в нашей стране иммуноферментная система для определения концентрации ферритина в сыворотке крови человека, основанная на применении моноклональных антител, разрабатывается в аналитической лаборатории **ЗАО "Алкор Био".**Для успешного применения в лабораторной практике создаваемый продукт должен удовлетворять всем требованиям к его качеству, не уступать по аналитическим характеристикам зарубежным аналогам, а также обладать стоимостью, обеспечивающей возможность проведения регулярных скрининговых обследований.

**1. Актуальность проблемы**

Ферритин - растворимый в воде комплекс гидроксифосфата железа с белком апоферритином. Наибольшее его количество находится в клетках печени, селезенки, костного мозга и ретикулоцитах, где наиболее интенсивно проходят процессы синтеза, созревания и деградации эритроцитов и ферритин активно участвует в метаболизме и перераспределении железа в организме.

Способность синтезировать ферритин появилась у клеток на ранних этапах эволюции. Характерные аналоги ферритина найдены у грибов, бактерий, растений. У животных ферритин обнаружен в тканях аннелидовых червей, моллюсков, насекомых, рыб, амфибий и млекопитающих [1, 2, 3]. У позвоночных защита от токсического эффекта железа и активных форм кислорода осуществляется двумя железосвязывающими белками: внеклеточными трансферринами и внутриклеточными ферритинами. Оба сохраняют железо в безопасной окисленной форме Fe(III), которая не катализирует продукцию свободных радикалов. Ферритин содержит 15-20% общего количества железа в организме.

Концентрация ферритина в сыворотке крови позволяет оценить общие запасы железа в организме [4]. У здоровых людей содержание ферритина в плазме крови составляет 20-350 нг/мл. Падение концентрации ниже 10 нг/мл свидетельствует о развитии железодефицитной анемии, в то время как при избыточном накоплении железа концентрация ферритина может возрастать до нескольких тысяч нг/мл.

Железодефицитная анемия является самым распространенным анемическим синдромом и составляет приблизительно 80% заболеваемости всеми видами анемий. Ее распространенность определяется физиологическими, патологическими, экологическими и социальными факторами. Предполагают, что в мире страдает железодефицитной анемией около 1,8 миллиарда человек (ВОЗ, 1998). Согласно данным ВОЗ (1992), дефицит железа определяется как минимум у 20-25 % всех младенцев, у 43 % детей в возрасте до 4 лет и 37 % детей от 5 до 12 лет. Даже в развитых странах эти цифры не ниже 12 % у детей до 4 лет и 7 % детей в возрасте от 5 до 12 лет [5].

Из-за физиологических ежемесячных кровопотерь и вынашивания детей более чем у 51 % женщин детородного возраста во всем мире обнаруживается нехватка железа вплоть до отсутствия его запасов. Дефицит железа в III триместре беременности обнаруживается почти у 90% женщин и сохраняется после родов и лактации у 55% из них [5].

В России частота железодефицитной анемии приближается к показателю стран третьего мира. В некоторых регионах России (Север, Восточная Сибирь, Северный Кавказ) скрытый дефицит железа выявляется у 70-80% жителей. Это связано и с неблагоприятной экологической обстановкой, и с нерациональным питанием, вызванным снижением уровня жизни.

Негативные проявления данного заболевания разнообразны и тяжело переносимы. Это синдром хронической усталости, внезапная потеря сознания, нарушения менструального цикла, дизурические расстройства, извращение вкусовых ощущений, нарушения психики. ЖДА является отягощающим фактором при заболеваниях сердечно-сосудистой и пищеварительной систем. У детей анемии часто являются причиной замедления умственного и физического развития, снижения успеваемости. Взрослые страдают от мышечной слабости, длительной ремиссии после перенесенных инфекций, что приводит к экономическим потерям. Кажущаяся странность, несерьезность симптомов (сонливость, быстрая утомляемость) заставляют людей долгое время не обращаться к врачу с четкими жалобами, а приспосабливаться к болезни. Патология же прогрессирует и в итоге может привести к серьезным, порой необратимым нарушениям функций организма. Так, анемии являются частой причиной внутриутробной смерти плода, низкого веса новорожденных, они обуславливают до 20% материнских смертей [6].

В настоящее время общепринято, что диагноз железодефицитных состояний надо ставить до развития полной картины заболевания, т.е. до возникновения гипохромной анемии. При дефиците железа страдает весь организм, а гипохромная анемия - это поздняя стадия болезни.

В 1983 г. П. М. Альперин и Ю. Г. Митерев предложили новую классификацию форм железодефицитной анемии, которая в полной мере отражает все основные этиологические факторы, приводящие ее к развитию. Они выделяют:

постгеморрагические анемии;

нутритивные (алиментарные) анемии;

анемии при повышенном расходе железа в организме (например, при беременности, лактации, росте и созревании);

железодефицитные анемии при исходно недостаточном уровне железа;

железодефицитные анемии при его недостаточной резорбции (например, постгастрорезекционные, агастральные, анэнтеральные);

при перераспределении железа в результате инфекции, при воспалительных и опухолевых процессах;

при нарушении транспорта железа (например, гипотрансферринемические и атрансферринемические).

Регулярное определение ферритина используется для отслеживания быстрого истощения запасов железа во время беременности, у доноров крови и у пациентов, регулярно подвергающихся гемодиализу. Оно также имеет ценность для диагностики гемохроматозов, при мониторинге пациентов, которые регулярно подвергаются переливанию крови или железозаместительной терапии и составляют группу риска по аккумулированию избыточных запасов железа. Концентрация ферритина может повышаться при некоторых острых и хронических заболеваниях печени, при голодании и истощении, наличии воспалительных процессов, инфаркте миокарда. Можно использовать определение ферритина для диагностики и мониторинга онкологических заболеваний.

К современным методам ранней диагностики железодефицитных состояний (гипосидероза) относятся определение концентрации железа в сыворотке, общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС), трансферрина и ферритина в сыворотке. Показатели метаболизма железа при различных видах анемий представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Показатели обмена железа в норме и при различных видах анемий (Авцын А. П., 1990).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели метаболизма железа | Норма | Железодефицитная анемия | Инфекционная, опухолевая анемия | Нарушение синтеза гема и глобина |
| Железо сыворотки, мкг/дл: |  |  |  |  |
| - мужчины | 50-160 | <50 | <50 | >180 |
| - женщины | 40-150 | <40 | <40 | >170 |
| ОЖСС, мкг/дл | 250-400 | >400 | 180 | 200 |
| Коэффициент насыщения трансферрина, % | 15-54 | <15 | <15 | >60 |
| Ферритин, нг/мл | 20-350 | <10-12 | >350 | 360-1000 |

Избыточное содержание железа в организме называют сидерозом или гиперсидерозом.

В 1971 г. Dagg e. a. предложили клиническую классификацию гиперсидерозов. Различают следующие формы гиперсидероза:

паренхиматозные формы (с преимущественным отложением железа в клетках паренхимы печени). К ним относятся: первичный наследственный гемохроматоз, сидероз при некоторых видах цирроза печени, вторичный сидероз при портокавальном анастомозе, сидероз при врожденной атрансферринемии;

"ретикулоэндотелиальные" формы, к которым относятся: генерализованные отложения железа при хронических рефрактерных (к специфическому лечению) анемиях, гемолитических анемиях, многократных гемотрансфузиях, при избыточном парентеральном введении железа, сидерозе банту;

локальные формы: идиопатический гемосидероз легких, легочно-почечный синдром Гудпасчера и гемосидероз почечного происхождения при ночной пароксизмальной гемоглобинурии.

При этих патологических состояниях концентрация ферритина в плазме крови повышена вследствие нарушения баланса обмена железа.

В то время как истощение запасов железа в организме является единственной причиной снижения уровня сывороточного ферритина, повышение уровня ферритина наблюдается не только при избытке запасов железа, но также в некоторых других ситуациях.

Определение ферритина можно использовать для диагностики и мониторинга ряда онкологических заболеваний. Ценность определения ферритина как онкомаркера подтверждают многие исследования [7, 8].

Высокие концентрации ферритина обнаруживаются в сыворотке пациентов с карциномой поджелудочной железы, раком легких, гепатомой и нейробластомой, острым миелобластным и лимфобластным лейкозами, лимфогранулематозом (болезни Ходжкина). Концентрация сывороточного ферритина обычно повышена при метастазирующем раке молочной железы. При онкологических заболеваниях концентрация ферритина в крови повышена как вследствие его активной секреции, так и за счет повышенного распада клеток и высвобождения цитоплазматического ферритина, например, при химиотерапии. После успешного лечения концентрация ферритина в сыворотке крови снижается.

Концентрация ферритина может также повышаться при некоторых острых и хронических заболеваниях печени (например, алкогольное поражение, гепатит), при голодании и истощении, воспалительных заболеваниях (легочные инфекции, остеомиелит, хронические инфекции мочевых путей, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, ожоговая болезнь), инфаркте миокарда [8, 9]. В этих случаях основной причиной увеличения содержания ферритина в крови является некроз клеток и высвобождение внутриклеточной фракции.

Определение ферритина в клинической практике позволяет улучшить диагностику нарушений метаболизма железа. Несомненными достоинствами метода являются также малая инвазивность и простота выполнения. Однако правильная интерпретация результатов требует ясного понимания как процессов метаболизма железа, так и учета других влияющих на уровень сывороточного ферритина факторов, например поражения печени или воспалительных процессов.

В настоящее время многие зарубежные производители предлагают наборы реагентов для иммуноферментного определения содержания ферритина в сыворотке, однако они очень мало распространены в России вследствие высокой стоимости и недостаточной информированности как медиков, так и населения о диагностической значимости данного показателя. Таким образом, необходимость разработки отечественной тест-системы для определения концентрации ферритина в крови человека очевидна.

**2. Метаболизм железа в организме человека**

Общее содержание железа в организме здорового взрослого человека составляет 3-5 г (у женщин часто меньше). 70% от этого количества входит в состав гемоглобина и 15-25% - ферритина и гемосидерина. Оставшаяся часть приходится на мышечный миоглобин (8%), цитохромы и железосеропротеины, выполняющие функцию транспорта электронов в митохондриях, и железосодержащие ферменты (оксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы) [10].

В сутки в организм с пищей поступает 1-2 мг железа. Наиболее интенсивное всасывание осуществляется в 12-перстной и тощей кишке и отсутствует в подвздошной. Усвояемость железа ограничена и определяется многими факторами, например, составом пищи, состоянием желудочно-кишечного тракта. Всасывание и транспорт железа к клеткам осуществляют трансферрины - белки бета-глобулиновой фракции, синтезируемые печенью. Различают две формы трансферринов. Мукозный трансферрин секретируется с желчью в кишечник, где окисляет и связывает один или два атома железа и проникает в энтероцит. На базальной стороне клетки он отдает железо ферритину или своему аналогу - плазматическому трансферрину.

Плазматический трансферрин, "нагруженный" железом, разносится с током крови по организму. При взаимодействии трансферрина со своим специфическим рецептором на поверхности клеточных мембран образуется эндоцитозная вакуоль, внутри нее происходит изменение рН, и железо, меняя степень окисления +3 на +2, освобождается от трансферрина. Белок вновь возвращается в кровеносное русло, а железо немедленно связывается низкомолекулярными хелаторами, такими как цитрат или аскорбиновая кислота. После этого железо может быть использовано для синтеза гемоглобина и железосодержащих ферментов или заключено для хранения в ферритин.

В организме человека происходит постоянное перераспределение железа.

В количественном отношении наибольшее значение имеет метаболический цикл (1): плазма --» красный костный мозг --» эритроциты --» плазма. Кроме того, функционируют циклы (2): плазма --» ферритин, гемосидерин --» плазма и (3): плазма --» миоглобин, железосодержащие ферменты --» плазма. Все эти три цикла взаимосвязаны через плазматический трансферрин. Единовременно он связывает лишь 3 мг железа, но ежедневный обмен железа через него в 10 раз больше. Трансферрин, таким образом, играет центральную роль в "круговороте" железа в организме.

Возможность выделительной системы человека экскретировать железо из организма ограничена. В день теряется около 1 мг железа, в основном путем слущивания слизистой оболочки кишечника и с желчью. Примерно 0,1 мг выводится с мочой, потом, волосами и ногтями. Потеря 15-30 мл крови ведет к потере 7,5-15 мг железа. Для хранения невыведенного избытка железа его необходимо конвертировать в удобную форму.

Свободные ионы железа могут образовываться в клетке при переносе между трансферрином и низкомолекулярными хелаторами, ферритином и хелаторами, хелаторами и митохондриями, при деградации ферритина в лизосомах, при избыточном накоплении гемосидерина. Несвязанное железо вместе с супероксид-радикалом, который восстанавливает Fe(III) (уравнение 1), и перекисью водорода, образующейся в ходе реакции Фентона (уравнение 2), поставляют высоко реакционноспособные гидроксильные радикалы. Суммой этих двух реакций является так называемая реакция Габера-Вейса (уравнение 3). Fe(III), получающееся при реакции Фентона (уравнение 2), также может быть восстановлено аскорбатом, что ведет к дальнейшей продукции радикалов.

Обладающий высочайшей активностью гидроксильный радикал вызывает перекисное окисление липидов, разрывы нитей ДНК и деградацию других биомолекул. С его действием сейчас связывают развитие нейродегенеративных и опухолевых заболеваний [11].

Таким образом, ионы железа постоянно находятся в связанной форме. Главные органы, выполняющие функцию хранения железа, - это печень, которая содержит около 700 мг железа, селезенка и костный мозг. Мышцы также важны из-за их большой массы, хотя реальная концентрация хранимого в них железа низкая - 40 мг/кг.

**3. Структура и функция молекулы ферритина.**

Молекула ферритина образована Н- и L- типами субъединиц (Н - heavy и L - light), кодируемых разными генами. Человека имеет около 16 копий Н-гена и около 5 копий L-гена, локализованных на различных хромосомах. Однако большинство из них являются безинтронными псевдогенами. Функционально активные Н- и L-гены человека располагаются в 12-13 сегменте длинного плеча 11 хромосомы и 13 сегменте длинного плеча 19 хромосомы соответственно. Ген L-цепи состоит из 878 пар азотистых оснований, Н-цепи - из 801 пары. Известна структура Н- и L-генов человека. Все они содержат три интрона различной длины. 5'-фланкирующие области генов Н- и L-цепей не имеют сходства, тогда как среди гомологичных цепей различных видов сохраняется высокая степень консервативности [12, 13, 14].

У человека аминокислотные последовательности Н и L идентичны на 54%. Аспартат, глутамат и их амиды составляют около 25% аминокислотных остатков, лизин и аргинин - 11-13%. Высоко содержание лейцина, но мало содержание изолейцина. У млекопитающих значительно варьирует содержание серина, пролина, глицина, лейцина, тирозина, фенилаланина и аргинина. Полипептидная цепь Н-типа человека состоит из 183 аминокислотных остатков, ее молекулярная масса 21 кДа. Молекулярная масса L-субъединицы, состоящей из 175 аминокислот, около 19 кДа.

Вторичная структура субъединиц почти на 70% представлена альфа-спиралями.

Третичная структура субъединиц животных и растений намного более консервативна, чем их первичная последовательность [15]. Каждая субъединица образована пучком из четырех длинных спиралей, расположенных параллельно, пятой короткой спирали, пересекающей ось субъединицы примерно под углом 60º и длинной вытянутой петли (общие размеры 25×25×50 ангстрем) (рис. 2).

Структура субъединиц стабилизируется лишь водородными связями, дисульфидные связи не обнаружены.

Каждая молекула апоферритина собрана из 24 структурно равнозначных субъединиц, вносящих одинаковый вклад в формирование четвертичной структуры. В 24-мерах смешанного состава (гетрополимерах) Н- и L- субъединицы имеют одинаковую конформацию и много сходных остатков в областях H-H, H-L и L-L межсубъединичных контактов, предоставляя возможность формирования гетерополимеров с любой из возможных композицией субъединиц.

Сборка целой молекулы апоферритина происходит следующим образом: первоначально формируются димеры из противоположно направленных субъединиц. Высокая эффективность формирования димеров обусловлена образованием большого числа гидрофобных связей. Далее 12 пар димеров ассоциируют с образованием цельной молекулы апоферритина, способной инкорпорировать железо. Субъединицы организованы таким образом, чтобы образовать полую, симметричную глобулу с наружным и внутренним диаметрами 125 и 80 ангстрем соответственно [16, 17].

Ближайшие к нам субъединицы изображены толстыми лентами, внутри глобулы в центре видно железосодержащее ядро.

Бислой альфа-спиралей перпендикулярен радиус-вектору белковой молекулы. Каждая субъединица контактирует в апоферритине с пятью соседними. Длинная петля, почти лишенная вторичной структуры, расположена на внешней поверхности молекулы. Кроме того, молекулы ферритина могут образовывать суперолигомеры - димеры и тетрамеры [18].

Субъединицы плотно упакованы, за исключением того, что в местах контакта трех субъединиц есть узкие каналы диаметром около 1 нм, пронизывающие глобулу. У ферритинов высших организмов вокруг этих осей третичной симметрии локализуются преимущественно гидрофильные остатки. В субъединицах ферритина позвоночных и растений боковые цепи, формирующие наиболее узкие части каналов на краю, открывающемся в полость молекулы, высоко консервативны. Это 3 симметрично расположенных аспартата и 3 глутамата. Каналы, проходящие вдоль осей третичной симметрии, являются главным входным путем для железа и сайтами окисления Fe(II) [19].

Внутренняя поверхность четвертичной складчатости, выстланная остатками 12 лейцинов высоко гидрофобна у L-ферритинов млекопитающих. В Н-цепях на стороне полости находятся 4 гистидина и обычно 4 лейцина на наружной поверхности.

Все молекулы ферритинов имеют полость для хранения железа. Несмотря на то, что внутренняя поверхность участвует в формировании железосодержащего ядра, ее аминокислотные остатки не высоко консервативны среди млекопитающих. Полагают, что главным фактором, определяющим формирование ядра, является распределение зарядов на внутренней поверхности.

Ферритины, изолированные из тканей млекопитающих, состоят из смеси изоферритинов с широким спектром состава субъединиц и содержания железа [20, 21]. Возможны 25 изоферритинов с соотношением субъединиц: Н24L0, H23L1, H22L2 … H0L24, но в основном спектр распределения субъединиц в изоферритинах заключен в пределах H22L2 - Н2L22. Обычно ферритины с преобладанием L-субъединиц характерны для органов, запасающих железо (печень и селезенка), и эти ферритины обычно имеют относительно высокий средний уровень содержания железа (более 1500 атомов Fe на молекулу). Богатые Н-субъединицами ферритины, характерные для сердца и мозга, имеют низкое содержание железа (менее 1000 атомов Fe на молекулу).

Вследствие различий по составу субъединиц молекулярная масса изоферритинов колеблется от 440 кДа у легких фракций изоферритинов селезенки до 500 кДа у тяжелых мышечных ферритинов. Общая молекулярная масса ферритина может удваиваться за счет включения кластера железа и достигать 900 кДа [22]. Однако ферритины обычно не полностью насыщены железом и обладают молекулярной массой, промежуточной между апоферритином и полностью заполненным холоферритином.

L-цепи являются более щелочными по сравнению с Н-цепями. Вследствие этого богатые Н-субъединицами ферритины эритроцитов, лимфоцитов, моноцитов, мышц, тимуса, мозга и других тканей обладают изоэлектрической точкой в диапазоне 4,5-5,0, а ферритины печени и селезенки с преобладанием L-субъединиц имеют pI 5,3-5,8 [23].

Субъединицы ферритинов содержат небольшое число углеводородов. Состав и количество сахаров сильно варьируют в зависимости от видовой и тканевой принадлежности, но у человека суммарно они составляют 2,4% массы апоферритинов печени и селезенки и около 5% у сердечных изоформ [24].

В отличие от высоко консервативной белковой глобулы, структура железосодержащих ядер довольно вариабельна, в том числе вследствие различий в составе, особенно в содержании неорганического фосфата [25]. Большая минеральная структура не имеет какой-либо преимущественной ориентации по отношению к белковой оболочке, хотя аминокислотные остатки на ее внутренней поверхности считаются важными для нуклеации. Нативные ядра человеческом ферритине - ферригидриты (5Fe2O3· 9H2O) с различной степенью кристалличности. Каждый атом Fe(III) окружен приблизительно шестью атомами кислорода на расстоянии 1,93 ангстрем. Нативные ферритины содержат неорганический фосфор, его содержание колеблется в пределах 10-40 атомов Fe на 1 атом Р в зависимости от уровня запаса железа [26].

Проникновение атомов железа в полость белковой глобулы и формирование железосодержащего кластера требует предварительного окисления двухвалентного железа до трехвалентного [27].

Работы, выполненные на рекомбинантных ферритинах, содержащих субъединицы одного типа, свидетельствуют о том, что ферроксидазная активность связана с Н-цепями. L-цепи в ферритинах позвоночных лишены внутрисубъединичных ферроксидазных центров [28]. Несмотря на это, ферритин селезенки с высоким процентом L-цепей (85%) имеет высокое содержание железа (в среднем 2700 атомов на молекулу). Рекомбинантные L-гомополимеры человека при экспрессии в E. coli связывают менее 10 атомов Fe на молекулу, в то время как Н-гомополимеры при тех же условиях аккумулируют до 200-300 атомов.

Эти экспериментальные наблюдения привели к заключению, что L-цепи лучше для нуклеации ферригидрита. Возможным объяснением этому может быть то, что их поверхности, обращенные в полость, имеют больше карбоксильных лигандов, чем Н-цепи. Слабая феррроксидазная активность L-цепей может быть объяснена наличием альтернативного сайта окисления Fe(II), образованного His136 и Asp139 в качестве лигандов металла [29]. Напротив, Н-ферритины - относительно слабые ядрообразователи. Электронная микроскопия свидетельствует, что ядра рекомбинантных L-ферритинов и нативных гетерополимеров крупнее и регулярнее, чем у Н-ферритинов [30]. Н-цепи необходимы для быстрого окисления поступающего железа.

Функции двух типов цепей взаимно дополняют друг друга. Кинетика накопления и высвобождения железа оптимальна при определенном количественном соотношении между двумя субъединицами. В экспериментах с Н/L гетерополимерами, реорганизованными в разных пропорциях, показано, что железо инкорпорировалось оптимально в молекулах, содержащих от 5 до 8 Н-цепей, что соответствует составу изоферритинов селезенки и печени [31].

Возможным объяснением того, что изоформы, наиболее интенсивно инкорпорирующие железо, практически никогда не насыщены железом полностью, также является стремление сохранить условия, при которых скорость процессов обмена железа максимальна. Экспериментально установлено, что первоначальные этапы нуклеации (формирования центров роста кристаллов) и роста ядер протекают относительно медленно. С увеличением размеров кластера увеличивается и скорость присоединения или отрыва атомов железа; максимальная скорость обычно характерна для ядер, содержащих 2000-2500 атомов железа. При дальнейшем росте кристалла скорость обмена железом снижается. Такая закономерность связана с тем, что на самой поверхности ядра, достигшего необходимых размеров, образуются дополнительные центры окисления железа [32]. Данный механизм также увеличивает способность ферритина экстренно поглощать или высвобождать железо.

Ферритин выполняет в организме двойственную функцию. Он запасает в клетках растворимое железо, которое при необходимости может быть легко задействовано для синтеза различных веществ. В то же время ферритин защищает организм от токсического действия ионов металлов. Помимо железа ферритин способен связывать и другие ионы, некоторые из которых токсичны (алюминий, бериллий).

Механизмы и кинетика обмена железа в организме изучаются очень интенсивно. Детально установить механизм процессов обмена железа in vivo очень сложно. Большинство исследований выполнено in vitro, и предложенные модели не могут быть полностью отождествлены с реальными процессами в организме.

Известно, что связывание железа трансферрином и ферритином требует предварительного изменения степени окисления металла от +2 до +3, а его высвобождение из этих молекул сопровождается обратным процессом восстановления. Важнейшую роль в этих процессах играют также низкомолекулярные хелатирующие соединения. Они являются необходимым промежуточным звеном в переносе железа от транспортных и депонирующих белков к местам утилизации железа.

In vitro железо может быть удалено и из ферритина, и из продукта его деградации гемосидерина (см. п. 4). Возможно высвобождение под действием небольших молекул-восстановителей, таких как 2,2-бипиридин, сульфонат батофенантролина, феррозин, дитионит и тиогликолят [33]. Высвобождение железа стимулируют также многие физиологические восстановители: восстановленные флавины, супероксид, дигидролипоат и родственные сульфгидрилы, цитрат, аскорбат и АТФ.

Интенсивность обмена железа в ферритине может регулироваться за счет его структурных особенностей. В кристаллическом состоянии поры, ведущие в полость апоферритина, открыты всего лишь на несколько ангстрем, но динамические структурные флуктуации могут позволить некоторым низкомолекулярным восстановителям достаточно быстро проникнуть внутрь белковой глобулы, непосредственно провзаимодействовать с поверхностными атомами железосодержащего ядра, восстановить и удалить их. Хелатор Fe(II) (которым может быть и сам редуктант) помогает железу найти путь из глобулы. Низкомолекулярные хелаторы трехвалентного железа, которые мобилизуют Fe(III) из ферритина в течение часов и дней (гидроксипиридиноны), также могут входить в молекулу и покидать ее, неся железо в виде Fe(III)-хелатных комплексов. Такая модель подтверждается исследованиями Takagi e. a. [34], показавшими, что локальная перестройка в сайтах кооперативных взаимодействий субъединиц (области тройничной складчатости) может увеличивать скорость выхода железа из ферритина. При замещении консервативного лейцина в позиции 134 пролином белок формировался, окислял Fe(II) и минерализовал Fe(III), а время полного растворения минерала (480 атомов железа) in vitro снижалось до 5 мин по сравнению со 159 мин для родительского белка.

Подтвержден также тот факт, что большие железосодержащие ядра ферритинов, подвергшихся деградации в лизосомах (см. п. 4.), не могут встраиваться в апоферритин в неизменном виде: белковые субъединицы не могут формировать оболочку вокруг минеральных ядер. Необходимо предварительное растворение ядра и синтез его в полости апоферритина de novo. Сходным образом происходит и обмен железа между двумя молекулами ферритина, например, между плазматическим ферритином, несущим железо от клеток ретикулоэндотелиальной системы, и ферритином печени.

**4. Катаболизм ферритина**

Как любому биологически активному веществу, участвующему в протекании окислительно-восстановительных процессов, ферритину для сохранения функциональной активности необходимо регулярное обновление белковой части. Ферритин из цитоплазмы поступает в лизосомы, где происходит протеолиз белковой оболочки и частичная деградация железосодержащего ядра. Образовавшиеся структуры носят название сидеросомального ферритина. Затем железо освобождается от связавших его хелаторов и постепенно заключается в новую, интактную молекулу апоферритина. Данное предположение подтверждается наличием в сидеросомах электрофоретически подвижных субъединиц, подвергшихся радикальному отщеплению N-концевых аминокислотных остатков и вследствие этого меньших по массе, являющихся аналогами цитоплазматических Н- и L-цепей [35].

В условиях избытка железа способность клеток синтезировать необходимое количество ферритина истощается. При этом частично железо так и остается в слабо структурированной форме хранения - сидеросомальном ферритине, а также подвергается дальнейшей деградации до нерастворимого гемосидерина. Название отражает источник содержащегося в нем железа - гемоглобин, но в гемосидерине железо находится не в форме гема. Гемосидерин представляет собой агрегат гидроокиси железа, соединенного с белками, гликозаминогликанами и липидами. При электронной микроскопии гемосидерин виден как нерегулярные массивные кластеры электронно-плотных частиц, большинство из которых окаймлены мембранами.

Гранулы гемосидерина распознаются антителами к ферритину, но их иммунореактивность значительно ниже, чем у цитозольного ферритина [36]. Эти данные подтверждают гипотезу, что гемосидерин - продукт деградации ферритина.

**5. Регуляция биосинтеза ферритина**

Механизмы регуляции биосинтеза ферритина интенсивно исследуются. Главным фактором, влияющим на метаболизм ферритина, является количество железа в организме. У животных и человека основным является посттранскрипционный механизм контроля. Механизм контроля трансляции был предложен после наблюдения, что в ответ на присутствие железа происходит увеличение количества ассоциированной с полисомами мРНК, при этом суммарное количество мРНК не возрастало, а уменьшалась фракция неактивной мРНК [37].

Секвенирование мРНК Н- и L-цепей ферритина показало наличие необычно длинных 5'-нетранслируемых областей (UTRs), размером соответственно 210 и 168 нуклеотидов [38]. С помощью компьютерного анализа было предсказано существование в пределах первых 75 нуклеотидов специфической стержне-петлевой структуры. Такая последовательность - железо-ответственный элемент (IRE, iron responsive element) - необходима для регуляции железом трансляции мРНК.

Первоначально предполагалось, что цитоплазматическая мРНК могла инактивироваться присоединением субъединицы ферритина, действующей как репрессор, а железо вызывало дерепрессию, инициируя сборку в 24-меры ферритина, способные затем инкорпорировать железо. Последующие работы подтвердили данное предположение, но репрессорным белком оказалась не субъединица ферритина, а цитозольный белок с молекулярной массой порядка 90 кДа, который специфически связывается с IRE с высокой аффинностью (Kd=10-10-10-11M). Этот белок известен как IRE-binding protein (IRE-BP), iron regulatory factor (IRF), ferritin repressor protein (FRP), P-90 или iron regulatory protein (IRP). Было установлено, что IRP является белком цикла Кребса - аконитазой [39]. Аконитаза содержит железосерный кластер [4Fe-4S], связывание железа в котором обратимо. В несвязанной форме [3Fe-4S] один из атомов железа в кластере замещается шпилькой мРНК, при этом аконитаза действует как репрессор трансляции. При повышении уровня железа в цитоплазме железосерный кластер принимает форму [4Fe-4S], шпилька мРНК вытесняется из кластера, аконитаза диссоциирует от мессенджера и начинается синтез субъединиц ферритина.

Важным фактом является то, что шпильки мРНК (IRE) свойственны не только для мРНК ферритина [40]. Аналогичные структуры, способные связываться с теми же IRP, обнаружены в 3'-нетранслируемой области мРНК клеточного рецептора трансферрина (TfR), 5'-UTR эритроид-специфической синтетазы дельта-аминолевулиновой кислоты (eALAS).

Железо регулирует экспрессию TfR в направлении, противоположном экспрессии ферритина: высокий уровень железа ведет к низкой экспрессии TfR, и наоборот. Связывание c IRP предохраняет мРНК TfR от деградации. Таким образом, когда существует необходимость в железе, синтезируется больше TfRs, что позволяет клеткам захватывать больше железа, и когда клетки насыщены железом, синтезируется больше ферритина для защиты от токсического действия.

Первые стадии биосинтеза гема, возможно, лимитирующие скорость процесса, катализирует eALAS. Как и для ферритина, связывание с IRP блокирует инициацию трансляции eALAS.

мРНК митохондриальной аконитазы также содержит один IRE в 5'-UTR, который связывает IRP, поэтому и синтез собственно аконитазы может регулироваться железом. Когда количество железа ограничено, аконитазная активность IRP и, возможно, митохондриальных ферментов увеличивается с последующим увеличением потребления цитрата. При избытке железа происходит обратное, с возможным увеличением аккумуляции клеточного цитрата. Очевидная прямая координация уровня цитрата и железа физиологически важна, так как цитрат - одна из главных клеточных железосвязывающих молекул, подобная буферной системе.

Помимо железа, синтез ферритина регулируется на различных уровнях многими другими веществами во время развития организма, клеточной дифференцировки, при воспалительных процессах [41]. Это могут быть различные гормоны (тироид-стимулирующий гормон, эстрогены), цитокины (интерлейкины 1 и 6), фактор некроза опухоли, инсулин, цАМФ, гем, оксид азота (II), перекись водорода.

**6. Ферритин в циркуляторном русле**

Первое прямое свидетельство присутствия ферритина в сыворотке крови получили Reissman и Dietrich в 1956 г [42]. Первоначально ферритин был найден в сыворотке пациентов с некрозом печени и перегрузкой железом, однако после развития чувствительного иммунорадиометрического анализа его удалось обнаружить и в нормальной сыворотке [43].

Внеклеточные ферритины, найденные в сыворотке и биологических жидкостях, составляют меньшую часть от общего ферритина. Плазматический ферритин имеет низкое содержание железа (0,02-0,07 мкг Fe на мкг белка в сравнении с более 0,7 мкг Fe на мкг белка в печени и селезенке).

Источник и механизм продукции плазматического ферритина до сих пор во многом неясен. Часть циркулирующего ферритина выделяется из разрушающихся тканей, например при циррозе печени, инфаркте миокарда. Однако наличие в молекуле специфически гликозилированных субъединиц и тонкая регуляция количества ферритина в крови в соответствии с уровнем железа в норме и при различных патологических процессах показывает, что главным источником плазматического ферритина является его активная секреция. В частности, секреция выполняется фагоцитами, осуществляющими деградацию гемоглобина. При этом ферритин выполняет функцию транспорта железа от клеток ретикулоэндотелиальной системы к гепатоцитам, синтезирующим гемоглобин de novo.

Места синтеза ферритина, подлежащего секреции, и тканевого ферритина также различны. Показано, что секреторный белок синтезируется на полирибосомах, связанных с мембранами эндоплазматического ретикулума, где осуществляется дальнейший процессинг молекулы, включая гликозилирование. Синтез ферритинов, секреция которых не предусмотрена, протекает на свободных цитоплазматических рибосомах [44].

Предположение, что секретируемые ферритины функционально активны, основано на идентификации специфических рецепторов на различных клеточных мембранах. Такие рецепторы были описаны на клетках печени, лимфоцитах и эритробластах человека. До настоящего времени неясно, сколько типов рецепторов существует, но главное очевидное различие найдено между ними на клетках печени и других типах клеток. Рецепторы печени обладают специфичностью с учетом соотношения Н- и L-субъединиц, в то время как лимфоцитарные рецепторы специфичны к Н-цепи.

Хотя многие тканевые изоферритины могут высвобождаться в плазму, обнаружены четкие различия в динамике циркуляции тканевого и плазматического ферритинов. Так, скорость удаления из плазмы тканевых ферритинов очень высока (период полувыведения Т1/2 составляет примерно 9 мин), в то время как количество инъецированного меченого плазматического ферритина уменьшалось на 50% лишь спустя 30 часов. В норме в плазме способны накапливаться изоформы L24 и гликозилированные молекулы, богатые L-субъединицами, но содержащие мало железа [45].

Значительное увеличение содержания характерных для опухолевых клеток фракций ферритинов с повышенным количеством Н-субъединиц может быть следствием нескольких причин:

интенсивного некроза опухолевой ткани из-за недостаточности трофики быстро растущей опухоли;

эффективной противораковой терапии, приводящей к прямому высвобождению цитозольного ферритина;

активного синтеза и секреции специфических опухолевых форм ферритинов;

патологического перераспределения железа с его накоплением в клетках ретикулоэндотелиальной системы;

изменений функционирования печени, приводящих к нарушению циркуляции ферритина.

Взаимосвязь плазматического ферритина со многими физиологическим процессами в организме позволяет отнести его к белкам острой фазы и к опухолевым маркерам.

**7. Содержание ферритина в сыворотке крови**

Таблица 2. Содержание ферритина в сыворотке крови в норме.

|  |  |
| --- | --- |
| Возраст | Содержание ферритина, нг/мл (мкг/л) |
| Новорожденные | 25-200 |
| 1 месяц | 200-600 |
| 6 месяцев - 15 лет | 30-140 |
| Взрослые: мужчины | 20-350 |
| Женщины | 10-150 |
| Беременность: Первый триместр | 56 |
| Второй триместр | 27 |
| Третий триместр | 10 |
| DPC "Immulite" | 1.22 |

В первый месяц после рождения концентрация ферритина повышена в связи переходом от фетальной формы гемоглобина к взрослой.

Содержание ферритина в плазме у женщин репродуктивного возраста значительно меньше, чем у мужчин. Это связано с ежемесячными физиологическими кровопотерями, а также с деторождением. За весь период беременности дополнительно расходуется около 1 г железа, что явно прослеживается в прогрессивном снижении ферритина в крови. В третьем триместре беременности концентрация ферритина минимальна и граничит со значениями, характерными для ЖДА. Лактация также сопровождается повышенным расходом железа, так как молочная железа продуцирует белок с подобными трансферрину свойствами - лактоферрин.

В постменопаузальный период содержание железа и концентрация ферритина в организме женщин возрастают, приближаясь к показателям у мужчин [46].

В случае перегрузки организма железом концентрация ферритина превышает 400-500 нг/мл, а при ярко выраженном гемохроматозе может достигать 10 000 нг/мл и более.

Несмотря на низкое содержание железа в плазматическом ферритине, концентрация ферритина в плазме коррелирует как с резервными запасами железа в организме, так и его общим количеством. Определяя в сыворотке крови содержание ферритина, на самом деле мы определяем концентрацию белковой части комплекса, апоферритина. Концентрация апоферритина в крови соответствует общему уровню ферритина в тканях и, следовательно, содержанию запасов железа.

При повторных заборах крови (такая процедура является способом терапии перегрузки организма железом) запасы железа уменьшаются. Это подтверждается косвенными лабораторными тестами (снижением уровня гемоглобина, насыщения трансферрина). При этом концентрация ферритина в плазме также снижается.

При повторных переливаниях крови, что является способом терапии при сидероахрестических и гемолитических анемиях - неиспользовании железа для синтеза гема или повышенном разрушении эритроцитов, запасы железа в организме быстро увеличиваются в связи с ограниченными способностями организма к выделению избытка железа (так называемый ятрогенный трансфузионный сидероз). Пропорционально количеству запасаемого железа возрастает и концентрация ферритина в плазме.

Рис. 5 Г. Диапазон значений концентраций ферритина в норме (область, выделенная серым) и при различных патологиях [47]. Горизонтальный штрих - среднее значение в группе.

Для здоровых лиц был предложен фактор эквивалентности (коэффициент пересчета): 1 нг ферритина в 1 мл сыворотки соответствует 8 мг (143 мкмоль) железа, хранимого в депо.

Таким образом, диагностическая ценность измерения сывороточного ферритина неоспорима.

**8. Иммунологические свойства ферритина**

В настоящее время для измерения концентрации ферритина в сыворотке крови используются иммунологические методы анализа. Для правильного определения исследуемого антигена необходимо использовать высокоспецифичные к анализируемому веществу антитела. Правильный выбор антител можно сделать, зная особенности антигенного строения ферритина.

Ферритин представляет собой сложный белок с выраженной четвертичной структурой (см. п. 3.). Вследствие этого большинство антигенных детерминант на его поверхности являются конформационно зависимыми. В литературе описаны специфичность и аффинность широкого круга как поликлональных, так и моноклональных антител к ферритину. Показано, что антитела обладают специфичностью не только в межвидовом, но и в межтканевом отношении. Так, в зависимости от относительного содержания в молекуле Н- и L-субъединиц антитела проявляют различное сродство к ферритину. Например, в работе [49] при использовании в качестве иммуногена ферритина из печени человека перекрестная реактивность полученных моноклональных антител с селезеночным ферритином составляла 74%, а с сердечным ферритином - всего 13%.

Белковая оболочка, лишенная кластера железа, проявляет большую иммунологическую активность по сравнению с ферритином, нагруженным железом. Вероятно, это вызвано повышением конформационной лабильности молекулы, что способствует вовлечению во взаимодействие с антителами участков, не доступных или малодоступных в нативной молекуле. Адсорбция апоферритина на полистироле приводила к практически полной утрате иммунологической реактивности, что также указывает на конформационный характер эпитопов молекулы [50].

Антитела к одиночным субъединицам ферритина выявили существенные отличия в их антигенном строении. Антигенные детерминанты Н- и L-субъединиц ферритина отличаются друг от друга, а также от антигенных детерминант нативного ферритина. Часть антигенных детерминант локализована во внутренней полости молекулы и в районах межсубъединичных контактов, и маскируется взаимодействием субъединиц при образовании молекул апоферритина и ферритина.

Данные работ [51, 52] свидетельствуют о том, отдельная субъединица ферритина обладает несколькими эпитопами для связывания с антителами. Однако сопоставление пространственных размеров одного эпитопа (в типичном случае около 2х3 нм) и субъединицы ферритина (5,5х2,7 нм) приводит к заключению, что одна субъединица ферритина способна связать только одну молекулу антитела. Эксперименты [53] по исследованию конкуренции антител показали, что основные (иммунодоминантные) эпитопы ферритина для моно- или поликлональных антител перекрываются и, скорее всего, образуют кластеры, группируясь в пределах ограниченного участка антигенной поверхности субъединицы или зоны контакта субъединиц. Под влиянием стерических факторов одновременное связывание двух различных молекул антител в пределах одного кластера либо исключено, либо, по крайней мере, затруднительно.

Из общего числа кластеров эпитопов, максимальное количество которых ограничено числом субъединиц ферритина (24) только 3-4 доступны для одновременного связывания антител. Данный вывод о максимальной валентности ферритина сделан в работе [54] на основании геометрических расчетов по известному внешнему диаметру сферической глобулы ферритина (12-13 нм) и минимальному расстоянию между центрами двух молекул антител, способными расположиться на антигенной поверхности без стерических затруднений (12-14 нм).

Определение концентрации ферритина в сыворотке крови первоначально осуществлялось радиоиммунологическими методами, основанными на конкуренции за связывание с антителами антигена из сыворотки крови и его радиоактивно меченого аналога [55]. Несколько позднее стал применяться неконкурентный иммунорадиометрический метод, использующий возможность одновременного связывания с молекулой ферритина двух молекул антител [56].

Особенностью ферритина является наличие нескольких сайтов связывания антител, некоторые из них повторяются. Как было сказано выше, в целом глобула обладает размерами, достаточными для одновременного связывания с четырьмя молекулами антител. Поэтому для выявления ферритина в основном используют неконкурентный метод анализа. Данный выбор связан не только со сложностью конъюгирования ферритина с меткой и возможностью нарушения при этом его антигенной структуры, но и с необходимостью обеспечения высокой чувствительности анализа для выявления ЖДА, недостижимой при конкурентной схеме.

Применение моноклональных антител с различной эпитопной направленностью для связывания и детекции антигена делает возможным проведение иммунологической реакции в одну стадию, при этом отсутствует конкуренция между "верхними" и "нижними" антителами за связывание с общими эпитопами, искажающая результаты анализа. Проведение анализа в одну стадию позволяет снизить расход реагентов и стоимость анализа, уменьшить занятость лабораторного оборудования и значительно сэкономить рабочее время.

9. Основные характеристики иммуноферментных тест-систем для количественного определения ферритина

В настоящее время практически все предлагаемые тест-системы основаны на неконкурентном методе определения ферритина. Однако используемые разными производителями антитела, поверхность твердой фазы, способы детекции сигнала и другие параметры разнятся очень значительно (см. п. 9).

Результаты сравнения аналитических характеристик тест-систем производства различных фирм приведены в табл. 3.

Таблица 3. Аналитические характеристики наборов для определения ферритина различных производителей.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Производитель | Особенности методики | Используемые антитела | Первая и последняя КП, нг/мл;  аттестация | Чувст витель ность, нг/мл | Эффект высоких концент раций, нг/мл |
| DPC "Immulite" | Одностадийный "сэндвич", инкубация 30мин, объем сыворотки 10 мкл, регистрация хемилюминесценции. | Иммобилизованные - мышиные моноклональные, конъюгат - козьи поликлональные со щелочной фосфатазой. | 10; 1500  IS 80/578 | 1.5 | 73 000 |
| Roche "Cobas Core" | Одностадийный "сэндвич". В качестве "твердой фазы" используются полистирольные шары. Инкубация 15мин/37°С, объем сыворотки 20 мкл. Субстрат - ТМБ. | Мышиные моноклональные к 2-м эпитопам для иммобилизации и конъюгирования с ПХ. | 75; 1200  IS 80/602 | 2 | 300 000 |
| Delfia | Двухстадийный "сэндвич", обе инкубации по 1 часу при комнатной Т, объем сыворотки 20 мкл. Регистрация флуоресценции (Eu метка). | Мышиные моноклональные. | 2; 1000  IS 80/578 | 0.5 | 120 000 |
| IBL | Одностадийный "сэндвич", инкубация 45 мин при комнатной Т, объем сыворотки 20 мкл. | Иммобилизованные - кроличьи, для конъюгирования с ПХ - моноклональные мышиные. | 15; 1000  IS 80/602 | 5 | 12 000 |
| Randox | Турбидиметрический метод измерения | Антисыворотка на латексных частицах. | 5; 450 | 5 | 2 000 |
| DSL | Двухстадийный "сэндвич", инкубации 30 и 60 мин при комнатной температуре, объем сыворотки 50 мкл. | Поликлональные козьи против селезеночного ферритина человека, метка - I125 | 8; 1000  IS 80/602 | 3.6 | 10 000 |
| Beckman Coulter | Одностадийный "сэндвич", инкубация 20 мин при 36,5°С, объем сыворотки 10 мкл. | Парамагнитные частицы, покрытые козьими АТ против иммуноглобулинов мыши, связывающие мышиные моноклональные АТ к ферритину; конъюгат - козьи АТ со щелочной фосфатазой | 10; 1500 | 0.2 |  |
| Roche "Elecsys" | Одностадийный "сэндвич". Общее время проведения анализа - 18 мин. Объем сыворотки 15 мкл. Регистрация электрохемилюминесценции. | Мышиные моноклональные к 2-м эпитопам для иммобилизации и конъюгирования с ПХ | 0,5; 2000 | 0.5 | 200000 |
| Алкор Био | Одностадийный "сэндвич", инкубация 30мин/37°С или 45 мин при комнатной Т, объем сыворотки 20 мкл. | Мышиные моноклональные к 2-м эпитопам для иммобилизации и конъюгирования с ПХ | 10; 1000  IS 80/578 | 5 | 10 000 |

В табл.4 приведена ориентировочная стоимость реагентов, необходимых для выполнения одного анализа наборами реагентов разных производителей. Стоимость рассчитана по ценам производителя или его официального дистрибьютора в России (при условии проведения анализа в соответствии с инструкцией производителя).

Таблица 4. Стоимость определения ферритина наборами различных производителей.

|  |  |
| --- | --- |
| Производитель | Цена, $ |
| VedaLab | 4.17 |
| IBL | 3.66 |
| OrgenTec | 3.63 |
| Sigma | 3.05 |
| DRG | 2.66 |
| Roche "Elecsys" | 2.16 |
| Roche "Cobas Core" | 2.04 |
| Алкор Био | 1.52 |
| DPC "Immulite" | 1.22 |

Разработанный ЗАО "Алкор Био" набор "ИФА-ферритин" представляет собой гетерогенную иммуноферментную систему для количественного определения ферритина в сыворотке крови человека. Основными компонентами такой системы является твердая фаза, конъюгат антитела с меткой и калибровочные пробы.

Из таблиц и4 видно, что "ИФА-ферритин" по своим характеристикам превосходит многие из зарубежных аналогов. Определение ферритина набором DPC "Immulite" немного дешевле, но необходимый для этого автоматический анализатор примерно в 5 раз дороже, чем оборудование, на котором проводится определение ферритина набором "ИФА-ферритин".

**Список литературы**

Ragland M, Briat JF, Gagnon J. Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. The Journal of biological chemistry. 1990; 265, 30: 18339-18344.

Sigel A, Sigel H. Metal Ions in biological systems: Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals. New York, 1998.

Theil EC. Ferritin: Structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. Ann Rev Biochem. 1987; 56: 289-315.

Bezwoda WR et al. The relationship between marrow iron stores, plasma ferritin concentrations and iron absorption, Scand J Haematol. 1979; 22: 113-20.

Complementary Feeding And The Control Of Iron Deficiency Anemia In The Newly Independent States Presentation By WHO At A WHO/Unicef Consultation Geneva, Switzerland 4 February (http://www.cdc.gov/mmwr/distrnds.html).

1999 Report of the UNICEF/WHO Regional Consultation Prevention and Control of Iron Deficiency Anemia in Women and Children. 3-5 February 1999, Geneva, Switzerland (http://www.who.int/nut/ida.htm).

Grail A, Hancock BW, Harrison P. Serum ferritin in normal individuals and in patients with malignant lymphoma and chronic renal failure measured with seven different commercial immunoassay techniques. J Clin Pathol 1982; 35: 1204-1212.

Milman N, Pedersen L. The serum ferritin concentration is a significant prognostic indicator of survival in primary lung cancer. Oncology reports, 2002; 9: 193-198.

Назаренко ГИ, Кишкун АА. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М., Медицина, 2000, 544с.

Crichton RR. Ferritin: structure, synthesis and function. New Engl J Med. 1971; 284: 1413-1422.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 1984; 219: 1-14.

Theil EC. Ferritin: Structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. Ann Rev Biochem. 1987; 56: 289-315.

Costanzo F, Colombo M, Staempfli S, Santoro C, Cortese R. Structure of gene and pseudogenes of human apoferritin H. Nucleic Acids Res. 1986; 14: 721-736.

Santoro C, Marone M, Silengo L. Cloning of the gene coding for human L apoferritin. Nucleic Acids Res. 1986; 14: 2863-2876.

Lawson DM, Artymiuk PJ, Yewdall SJ, Arosio P, Harrison PM. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. Nature. 1991; 349: 541-544.

Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochimica et Biophysica Acta. 1996; 1275: 161-203.

Munro HN, Linder MC. Ferritin structure, biosynthesis, and function. Physiological Reviews. 1978; 58: 317-396.

Gerl M, Jaenicke R. Self-assembly of apoferritin from horse spleen after reversible chemical modification with 2,3-dimethylmaleic anhydride. Biochemistry. 1988; 27: 4089-4097.

Harrison PM, Treffry A, Lilley TH. Ferritin as an iron-storage protein: mechanisms of iron uptake. J. Inorg. Biochemistry. 1986; 27: 287 - 293.

Arosio P, Adelman TG, Drysdale JW. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. J. Biol. Chemistry. 1978; 253: 4451-4458.

Ruggieri G, Iacobello C, Albertini A, Brocchi E, Levi S, Gabri E, Arosio P. in Ferritins and Isoferritins as Biochemical Markers (Albertini A, Arosio P, Drysdale JW, eds). 1984; pp. 67-78, Elsevier, Amsterdam.

Stefanini S, Chiancone E, Arosio P, Antonini E. Structural heterogeneity and subunit composition of horse ferritin. Biochemistry. 1982; 21: 2293-2299.

Powell LW, Alpert E, Isselbacher KJ, and Drysdale JW. Human isoferritins: organ specific iron and apoferritin distribution. Br J Haematol, 1975; 30: 47-55.

Shinjyo S, Abe H, and Masuda M. Carbohydrate composition of horse spleen ferritin. Biochim Biophys Acta, Nov 1975; 411: 165-167.

Wade VJ, Treffry A, Laulhere JP, Bauminger ER, Harrison PM. Structure and composition of ferritin cores from pea seed (Pisum sativum). Biochem. Biophys. Acta. 1993; 1161: 91-96.

Treffry A, Harrison PM, Cleton MI, WC de Bruijn, Mann S. A note on the composition and properties of ferritin iron cores. J. Inorg Biochem. 1987; 31: 1-6.

Treffry A, Bauminger ER, Hechel D, Harrison PM. Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin: a study aided by site-directed mutagenesis. Biochem. J. 1993; 296: 721-728.

Bauminger ER, Harrison PM, Hechel D, Nowik I, Yewdall SJ. Iron (II) oxidation and early intermediates of iron-core formation in recombinant human H-chain ferritin. Biochemical J. 1993; 296: 709-719.

Harrison PM, Ford GC, Rice DW, Smith JMA, Treffry A, White JL. in Frontiers in Bioorganic Chemistry (Xavier A, ed.), 1986, pp. 268-277, VCH Publishers, Weinheim, Germany.

Wade VJ, Levi S, Arosio P, Mann S. Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in ferritin. J. Mol. Biol. 1991; 221: 1443-1452.

Levi S, Yewdall SJ, Rovida E, Arosio P. Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. Biochem J. 1992; 288: 591-596.

Sun S, Arosio P, Levi S, Chasteen ND. Ferroxidase kinetics of human liver apoferritin, recombinant H-chain apoferritin, and site-directed mutants. Biochemistry. 1993; 32: 9362-9369.

Sirivech S, Frieden E, Osaki S. The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. Biochem J. 1974; 143: 311-315.

Takagi H, Shi D, Allewell, NM, Theil EC. Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. J. of Biol. Chem., 1998; 273, 30: 18685-18688.

Andrews SC, Treffery A, Harrison PM. Siderosomal ferritin. The missing link between ferritin and haemosiderin. Biochem J. 1987; 245: 439-446.

Cooper JP, Iancu TC, Ward RJ, Peters TG. Quantitative analysis of immunogold labelling for ferritin in liver from control and iron-overloaded rats. Histocem J. 1988; 20: 499-509.

Dickey LF, Sreedharan S, Theil EC, Didsbury JR, Kaufman RE. Multiple red cell ferritin mRNAs, which code for an abundant protein in the embryonic cell type, analyzed by cDNA sequence and by primer extension of the 5'-untranslated regions. J. Biol. Chem. 2001; 261: 949-955.

Leibold EA, Munro HN. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988; 85: 2171-2175.

Kaptain S, Downey WE, Tang C, Klausner RD. A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 10109-10113.

Melefors TM, Goossen B, Johanson HE, Hentze MW. Translational control of 5-aminolevulinate synthase mRNA by iron- responsive elements in erythroid cells. J. Biol. Chem. 1993; 268, 5974-5978.

Hirayama M, Kohgo Y, Kondo H, Niitsu Y. Regulation of iron metabolism in HepG2 cells: a possible role for cytokines in the hepatic deposition of iron. Hepatology. 1993; 18: 874-880.

Reissman KR, Dietrich MR. On the presence of ferritin in the peripheral blood of patients with hepatocellular disease. J. of clinical investigation. 1956; 35: 588-595.

Addison GM, Beamish MR, Hales CN, Llewellyn P. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. J. of Clin. Pathol. 1972; 25: 326-329.

White K, Munro HN. Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. J. Biol.Chem. 1988; 263: 8938-8942.

Cragg SJ, Covell AM, Burch A, Worwood M. Turnover of 131I-human spleen ferritin in plasma. British J. of Haematology. 1983; 55: 83-92.

Yamashita N, Oba K, Nakano H, and Metori S. Age-related changes in concentrations of ferritin, glycosylated ferritin, and non-glycosylated ferritin. Nippon Ronen Igakkai Zasshi. 1996; 33: 754-760.

Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA, A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. The New Engl J of Medicine, 1974, 290, 22, 1213-1216.

Jacobs A, Miller F, Worwood M, et al. Ferritin in serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. Br Med J. 1972; 4: 206-208.

Cavanna F, Ruggeri G, Iacobell C, Albertini A, Arosio P. Development of a monoclonal antibody against human heart ferritin and its application in an immunoradiometric assay. Clinica Chimica Acta. 1983; 134: 347-356.

Лунев ВЕ, Мельникова ЯИ, Кошкин СА, Лунева НМ. Моноклональные антитела к ферритину селезенки человека. Получение и исследование взаимодействия с ферритином и апоферритином. Биохимия, 1993, том 58, вып. 5, 745-757.

Luzzago R, Arosio P, Albertini A. Immunochemical characterization of human liver and heart ferritins with monoclonal antibodies. Biochim. et biophys. acta. 1986; 872: 61-71.

Friguet B, Djavadi-Ohaniance L, Goldberg ME. Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to the denatured antigen. Molecular Immunology. 1984; 21: 673-677.

Гапеева ЕВ, Марцев СП, Изучение антигенной структуры ферритина. Выделение субъединиц ферритина и их иммунохимическая характеристика. Биоорганическая химия, 1992, т. 18, 2, 201-209.

Мельникова ЯИ, Лунев ВЕ, Прейгерзон ВА, Родионов МА. Моноклональные антитела к ферритину селезенки человека. Локализация эпитопов и количественные параметры связывания. Биохимия, 1993, том 58, вып. 5, 759-771.

Luxton AW, Walker WH, Gauldie J, Ali AM, and Pelletier C. A radioimmunoassay for serum ferritin. Clin. Chem., 1977; 23: 683-689.

Miles LE, Lipschitz DA, Bieber CP and Cook JD. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. Analyt Biochem 1974, 61: 209-224.