

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЦИНКОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ: *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЕ НА ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В.

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий

г. Минск, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru

Поступила в редакцию: 13.08.2021

**Аннотация.** Используя внутриклеточный и внеклеточный хелаторы для  $Zn^{2+}$  – ТРЕН и ДТРА, продемонстрировано существование специфических рецепторов на поверхности эритроцитов и внутриклеточных депо, отвечающих за поддержание цинкового гомеостаза. В тоже время было показано, что увеличение цитозольного пула лабильного  $Zn^{2+}$  свыше 100 нМ приводит к запуску процессов эриптоза, а цитотоксические эффекты цинка обусловлены внутриклеточными молекулярными механизмами, приводящими к выходу  $Zn^{2+}$  из клеточных депо. Более того, выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активности эритроцитов, при моделировании окислительного стресса, используя  $H_2O_2$  *in vitro*, что свидетельствует о прямом участии  $Zn^{2+}$  в запуске эриптоза, а дисбаланс “прооксиданты/антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера данного процесса. При этом обнаружен рост уровня экспрессии цитозольных тиол-содержащих белков металлотионеинов, как в эритроцитах, истощенных по  $Zn^{2+}$ , так и в клетках после индукции окислительного стресса *in vitro* путем воздействия  $H_2O_2$ . Это свидетельствует о функционировании данных белков в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе эритроцитов в условиях окислительного стресса.

**Ключевые слова:** эритроциты человека, цинковый гомеостаз, лабильный пул цинка, эстеразная активность, металлотионеины, окислительный стресс.

Вопрос о количестве цинка, необходимого для нормального функционирования клеток, до сих пор широко обсуждается в научной литературе. Концепция о “квоте цинка” была впервые предложена O’Halloran [1]. “Квотой цинка” называется общее содержание цинка в клетке, необходимое для ее оптимального роста – около 0,1–0,5 мМ (на одну клетку). Существуют типы клеток, которые не подчиняются этому правилу (напр.: определенные типы нейронов, клетки простаты) [2]. Таким образом, цинк обладает уникальной особенностью, которая заключается в том, что большое количество хелатируемого и лабильного цинка накапливается в ряде клеток и тканей.

В клетках млекопитающих цинк распределен следующим образом: в цитоплазме – 50%, в ядре – 30–40% и в мембране – около 10% [3]. Однако, значительное количество внутриклеточного цинка связывается с белками и таким образом опосредует их важные структурные и каталитические функции. Эти семейства белков называют цинковыми металлопротеинами. На модельных организмах получены данные о степени ассоциации цинка с такими белками. В дрожжах, например, главными Zn-связывающими белками являются Cu/Zn-СОД и преобладающий изофермент алкогольдегидрогеназа (Adh1). В дополнении к этим высокоаффинным сайтам, в клетке также существуют низкоаффинные Zn-связывающие сайты. Они включают слабосвязывающие сайты на белках, липидах, ДНК, а также низкомолекулярные компоненты, такие как, органические анионы (например, цитрат), аминокислоты (гистидин) и глутатион [4]. С учетом этих фактов, стало очевидно, что свободный цинк в клетках присутствует в очень низкой концентрации. Термин “свободный” используется обычно для обозначения специфичного цинка, который является свободно доступным для связывания с вновь синтезированными цинковыми металлопротеинами.

Исследования последних лет показали, что функции цинка более обширны, чем подразумевали ранее под простым определением – необходимый микроэлемент. С одной стороны, существуют прямые доказательства того, что цинк может функционировать как нейротрансмиттер [2]. С другой стороны,  $Zn^{2+}$  имитирует действие гормонов, ростовых факторов, цитокинов, что свидетельствует о том, что он может оказывать влияние на внутриклеточные молекулы [5]. Действительно,  $Zn^{2+}$  – хорошо известный ингибитор белковых тирозинфосфатаз. Интересен и тот факт, что ионы цинка связывают некоторые ростовые факторы и цитокины напрямую, изменяя их структуру, и тем самым, модулируя их биологическую активность. Установлено, что  $Zn^{2+}$  влияет на множество сигнальных молекул, включая РКС, Са/кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (CaMKII), Erk1/2, сАМР-зависимую протеинкиназу (РКА), протеинтирозинфосфатазу и каспазу-3 [5].

На сегодняшний день не остается сомнений в том, что цинк – необходимый структурный компонент иммунной системы, так как было показано, что именно недостаток цинка вызывает сильный иммунодефицит [3]. Было установлено, что локализация транскрипционного фактора Snail в ядре зависит от транспортеров ионов цинка семейства ZIP (в частности ZIP6) [4], а TLR4-опосредованное снижение внутриклеточного свободного цинка также зависит от изменения экспрессии транспортеров цинка. На основании этого было сделано заключение, что  $Zn^{2+}$  можно идентифицировать как внутриклеточный сигнальный ион [6]. Как межклеточные, так и внутриклеточные сигнальные функции  $Zn^{2+}$  влияют на процессы, которые контролируют пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Подобно кальцию, внутриклеточный статус цинка изменяется динамично в ответ

на внешние стимулы, и он способен их преобразовывать во внутриклеточные сигнальные процессы. Отличительной особенностью цинка в клеточной биологии является большая разница между общим (сотни мкМ) и «свободным» (десятки пМ) пулом цинка. Но даже в таких низких свободных концентрациях (диапазон от фМ до пМ) цинк обладает высоким сродством к каталитическим участкам многих белков и ферментов. Для возможности регуляции внутриклеточных процессов необходимо изменение концентрации «свободных» ионов цинка в клетке от базального уровня до сотен пМ. Стоит отметить, что в отличие от цинковой сигнализации внутриклеточные процессы с участием ионов кальция запускаются при превышении базального уровня (сотни нМ) на 1-2 порядка, причем величина общего уровня клеточного кальция составляет около 2 мМ. Как и для кальция, цинку нужна жесткая система контроля на клеточном уровне этих переходных процессов, т.к. повышение его концентрации может привести к цитотоксичности. К настоящему времени различные научные коллективы представили детальные аспекты, характеризующие эту систему контроля (мембранные белки-транспортеры, ответственные за вход, распределение, хранение и выброс цинка; Zn-связывающие белки – металлотионеины (MTs), Zn-чувствительные молекулы, которые поддерживают гомеостаз цинка), а также, какие нарушения на уровне клетки и организма могут происходить, если этот контроль нарушен [6]. Более того, в клетках млекопитающих могут присутствовать везикулярные сайты хранения ионов цинка [4]. Эти везикулы были обозначены таким термином, как «цинкосомы». Однако до сих пор не выявлена функция этих цинкосом в метаболизме и гомеостазе цинка. Некоторые исследователи предположили их роль в детоксикации избытка цинка. Также было отмечено, что стрессовые агенты, такие как оксид азота (NO) [5], повышают уровень лабильного цинка, вероятно, из-за высвобождения цинка из белков. Этот заново высвобожденный лабильный цинк впоследствии также накапливается в цинкосомах. Таким образом, цинкосома может служить для буферизации цитозольного цинка при кратковременных нарушениях гомеостаза цинка так же, как вакуоль в дрожжах [4]. Другие исследования показали, что цинкосомы участвуют в хранении цинка, который впоследствии может быть мобилизован при его дефиците в клетке [4, 5].

Цель данной работы – изучить связь цинкового гомеостаза с функционированием эритроцитов человека (в частности, с их жизнеспособностью) и выявить участие внутриклеточного лабильного пула  $Zn^{2+}$  в формировании защитных механизмов клеток при окислительном стрессе.

Эритроциты человека были выбраны в качестве объекта исследования, т.к. они являются подходящими клетками для оценки статуса цинка в организме (при попадании соединений цинка в кровь человека более 90% металла поступает именно в них), а отсутствие ядра позволяет исключить возможные генотоксические эффекты этого микроэлемента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь условно здоровых доноров в консерванте “гепарин”, полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000g в течение 15 мин и трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl (155 мМ). Инкубацию эритроцитов (1 %-ный гематокрит) с хлоридом цинка ( $ZnCl_2$ , 10–500 мкМ), внутриклеточным хелатором ионов цинка –  $N',N'$ -тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамином (TPEN, 10–100 мкМ), внеклеточным хелатором ионов цинка – диэтилендиаминпентауксусной кислотой (ДТРА, 10–100 мкМ) и пероксидом водорода ( $H_2O_2$ , 25–1000 мкМ) проводили при 37°C в течение 120 мин для первого и 30 мин для других агентов в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 155 мМ NaCl.

Оценку внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM. Для этого эритроциты, ресуспензированные в 10 мМ трисHCl буфере, содержащем 155 мМ NaCl pH 7,4 до 0,2% гематокрита, нагружали красителем, который находился в растворе плюроновой кислоты F 127 и ДМСО, в течение 30 мин при 37°C при постоянном перемешивании. Зонд, не связавшийся с лимфоцитами, отмывали путем центрифугирования суспензии клеток (2000g, 10 мин), ресуспензировали в исходном буфере, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте и дважды отмывали (2000g, 10 мин) в исходном буфере. Далее клетки модифицировали по цинковому гомеостазу согласно протоколу, описанному выше, и после этого проводили измерение интенсивности флуоресценции в FITC-N канале на проточном цитофлуориметре либо записывали кинетику флуоресценции на спектрофлуориметре.

Жизнеспособность эритроцитов контролировали по цитозольной эстеразной активности с помощью высоколипофильного красителя кальцеина-AM (Sigma) по интенсивности флуоресценции его дезэстерифицированной формы – кальцеина. Для этого суспензию эритроцитов (0,2% гематокрит), предварительно обработанной агентами, модифицирующими цинковый гомеостаз, инкубировали в 10 мМ трисHCl буфере + 155 мМ NaCl с раствором кальцеина-AM в ДМСО в течение 45 мин при 37°C в темноте и затем переводили в исходный буфер pH 7,4 для цитофлуориметрического анализа на проточном цитофлуориметре в FL-1H канале.

Степень образования свободнорадикальных соединений оценивали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ( $H_2DCF-DA$ , Molecular Probes). Для этого суспензию эритроцитов (0,2 % гематокрит) нагружали  $H_2DCF-DA$  в течение 30 мин при 37°C, затем отмывали путем центрифугирования 2000g, 10 мин в 10 мМ трисHCl буфере + 155 мМ NaCl pH 7,4 и ресуспензировали в исходном буфере. Далее клетки

инкубировали с сульфатом цинка в исследуемых концентрациях по протоколу, описанному выше, и измеряли кинетику испускания флуоресцирующего компонента данного зонда 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) при  $\lambda_{\text{возб/рег}} = 505/525$  нм на спектрофлуориметре.

Оценку содержания металлотионеинов (MTs) в эритроцитах проводили с помощью моноклональных антител UC1MT (Abcam), а в качестве изотипического контроля был использован IgG1. Об относительном содержании MTs в эритроцитах человека судили по отношению интенсивности флуоресценции комплекса UC1MT-IgG1-FITC ( $I_{\text{фл1}}$ ) к интенсивности флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC ( $I_{\text{фл2}}$ ), характеризующему неспецифическое связывание антител в клетках.

Цитофлуориметрический анализ проводили на FACSCanto II (Beckton Dickenson), а спектрофлуориметрический – на флуориметре “Cary Eclipse” (Varian). Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения модификации цинкового гомеостаза в эритроцитах человека были использованы следующие агенты: 1) сульфат цинка – для внесения дополнительных ионов  $\text{Zn}^{2+}$  в клетку из вне; 2) хелаторы цинка ТРЕН и ДТРА – для снижения уровня  $\text{Zn}^{2+}$  в цитозоле и на мембране клетки соответственно [7]; 3) пероксид водорода – для моделирования состояния окислительного стресса в клетке. В таблице 1 представлены результаты оценки изменения цитозольной концентрации лабильного пула цинка в эритроцитах человека с помощью FluoZin-3-AM [8] после инкубации с выбранными Zn-модифицирующими агентами.

Установлено, что инкубация суспензии эритроцитов с  $\text{ZnSO}_4$  в физиологической (10 мкМ); фармакологических (50 и 100 мкМ) и токсичных (500 мкМ) концентрациях в течение 2 ч *in vitro* приводит к дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3 (табл. 1). Так, при воздействии  $\text{ZnSO}_4$  в концентрации 10 мкМ интенсивность флуоресценции увеличивается в среднем на 15–25%, при инкубации с 50 мкМ – на 30–45%, при инкубации с 100 мкМ – на 50–75%, а при инкубации с 500 мкМ – на 130–170%. Используя разработанный нами способ [9] был проведен пересчет полученных относительных значений интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в численные значения. Установлено, что после инкубации суспензии эритроцитов с  $\text{ZnSO}_4$  в течение 2 ч внутриклеточная концентрация лабильных ионов цинка увеличивалась в среднем соответственно на 17–26 нМ, 30–43 нМ, 48–73 нМ и 131–177 нМ относительно интактных клеток. Инкубация эритроцитов человека с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрациях от 30 до 1000 мкМ, как показано в таблице 1, приводит также к статистически достоверному дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3, свидетельствующему об увеличении внутриклеточного пула  $\text{Zn}^{2+}$ . Так, при воздействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  в концентрациях 30–1000 мкМ, интенсивность флуоресценции FluoZin-3 увеличивается в среднем от 10 до 40% (табл. 1). В свою очередь, инкубация с внутриклеточным мембранопроницаемым хелатором ТРЕН, который обладает высокой аффинностью к  $\text{Zn}^{2+}$  ( $3,8 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) [7], в концентрациях 10–100 мкМ, выявила статистически достоверное дозозависимое снижение внутриклеточного пула  $\text{Zn}^{2+}$  в среднем на 10–50% по отношению к интактным клеткам (таблица 1). При проведении сравнительного анализа хелатирующего эффекта внутриклеточного хелатора ТРЕН с внеклеточным мембранопроницаемым хелатором ДТРА выявлены существенные различия в степени снижения внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка – хелатирующий эффект ионов цинка составил лишь 4–25% (табл. 1).

Параллельно с изучением уровня внутриклеточного пула  $\text{Zn}^{2+}$  в Zn-модифицированных эритроцитах проведена оценка их цитозольной эстеразной активности (с помощью флуоресцентного красителя кальцеина-AM) – основного маркера жизнеспособности клеток [10]. Как видно из таблицы 2, 2-часовое воздействие *in vitro* на клетки ионов цинка в физиологических (10 мкМ) и фармакологических (50–100 мкМ) концентрациях не сопровождается изменением жизнеспособности клеток. В свою очередь, воздействие ионов цинка в токсичной концентрации (500 мкМ) снижает их жизнеспособность до 40%, что свидетельствует о внутриклеточных

**Таблица 1.** Зависимость относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от концентрации агентов, модифицирующий цинковый гомеостаз, при их экспозиции с эритроцитами человека

[Агент], мкМ	Интенсивность флуоресценции FluoZin-3, %			
	ZnSO <sub>4</sub> ,	ТРЕН,	ДТРА,	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,
	2 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C
0	100	100	100	100
10	128,8±10,0	97,01±1,67	99,0±3,4	–
25	–	86,11±1,95	95,1±3,3	106,97±6,67
50	132,5±13,0	75,05±3,04*	87,3±3,6	–
100	166,1±15,0*	53,00±3,62*	76,1±4,8*	107,25±1,95*
500	254,5±25,0*	–	–	119,95±3,04*
1000	–	–	–	132,96±3,62*

За 100% принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах (контроль); \* – различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ( $p < 0,05$ )

**Таблица 2.** Зависимость относительной интенсивности флуоресценции кальцеина от концентрации агентов, модифицирующий цинковый гомеостаз, при их экспозиции с эритроцитами человека

[Агент], мкМ	Интенсивность флуоресценции кальцеина, %			
	ZnSO <sub>4</sub> ,	TPEN,	DTPA,	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,
	2 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C
0	100	100	100	100
10	94,72±1,52	120,45±4,56*	101,20±5,23	–
25	–	153,69±20,62*	115,67±13,21	89,00±5,55*
50	94,16±3,33	165,80±11,45*	95,30±10,23	–
100	93,72±2,42	170,20±5,67*	91,20±16,45	73,06±6,60*
500	56,19±2,21*	–	–	31,90±8,33*
1000	–	–	–	8,32±1,36*

За 100% принято значение интенсивности флуоресценции кальцеина в интактных эритроцитах (контроль); \* – различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ( $p < 0,05$ )

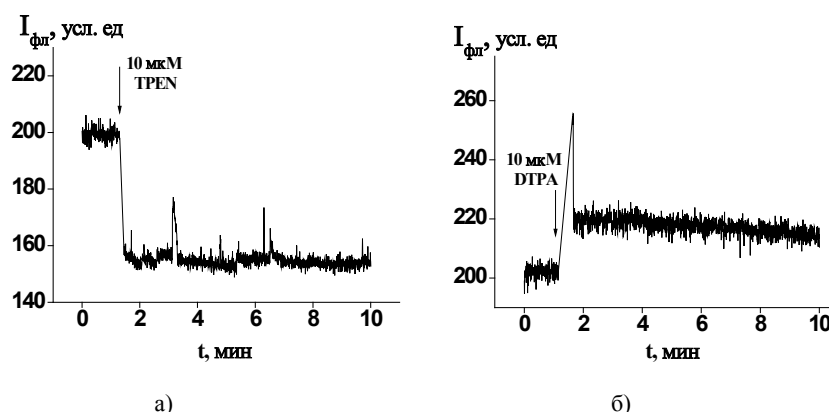
изменениях, предшествующих эритрозу. Воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в изученных концентрациях (30–1000 мкМ) приводит к снижению интенсивности флуоресценции кальцеина на 5–90%, что также свидетельствует об ингибировании цитозольной эстеразной активности в эритроцитах человека и запуску апоптотических процессов (табл. 2). Инкубация же клеток с внутриклеточным хелатором цинка TPEN в концентрациях 10–100 мкМ в течение 30 мин позволила обнаружить статистически достоверное увеличение интенсивности флуоресценции зонда в среднем на 20–75% (табл. 2). Однако, при воздействии на эритроциты мембранонепроницаемого хелатора DTPA в таких же концентрациях не обнаружено достоверного изменения активности эритроцитарных эстераз по отношению к интактным клеткам (табл. 2).

Более того, проведенный корреляционный анализ выявил обратную статистически значимую зависимость между изменением внутриклеточного уровня лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активности эритроцитов, подвергшихся воздействию *in vitro* ZnSO<sub>4</sub> ( $r_{s1} = -0,958$ ,  $p = 0,01$ ); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $r_{s2} = -0,98$ ,  $p = 0,003$ ) и TPEN ( $r_{s3} = -0,866$ ,  $p = 0,049$ ), но не DTPA ( $r_{s4} = 0,597$ ,  $p = 0,288$ ).

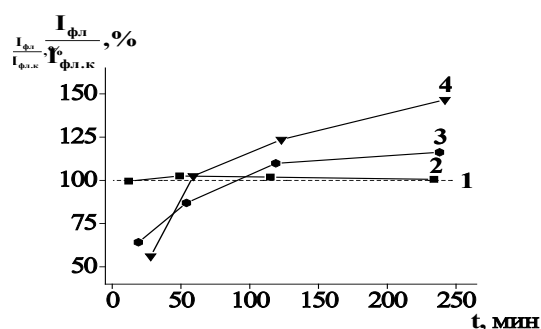
Чтобы объяснить разнонаправленные результаты по изменению активности клеточных эстераз, полученные при действии хелаторов двух типов, мы изучили кинетику флуоресценции FluoZin-3, встроенного в суспензию эритроцитов в течение 10 минут после добавления этих модифицирующих агентов. Как видно из рисунка 1А, при добавлении внутриклеточного хелатора TPEN к суспензии клеток было обнаружено резкое скачкообразное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 до базального уровня, что свидетельствует о необратимом истощении эритроцитов по Zn<sup>2+</sup>. В опытах, когда к эритроцитам был добавлен внеклеточный хелатор DTPA (рис. 1Б), мы наблюдали плавное нарастание интенсивности флуоресценции FluoZin-3, что свидетельствует об увеличении цитозольного уровня лабильных ионов цинка.

Т.е., при добавлении цинкового хелатора, который связывает этот ион на поверхности мембраны, происходит высвобождение Zn<sup>2+</sup>, запасенного в клеточных депо (например, металлотионеинов), для восполнения его недостатка на мембране и только при увеличении времени воздействия мы наблюдали плавное снижение уровня цитозольного цинка в результате истощения внутриклеточных запасов (табл. 1). Более того, можно предположить, что на поверхности эритроцитов находятся специфические рецепторы, отвечающие за поддержание цинкового гомеостаза [11].

С целью выявления одного из механизмов описанных выше внутриклеточных изменений при модификации цинкового гомеостаза в эритроцитах, было изучено образование в них свободнорадикальных соединений. На рисунке 2 показана кинетика интенсивности флуоресценции DCF в суспензии эритроцитов человека при



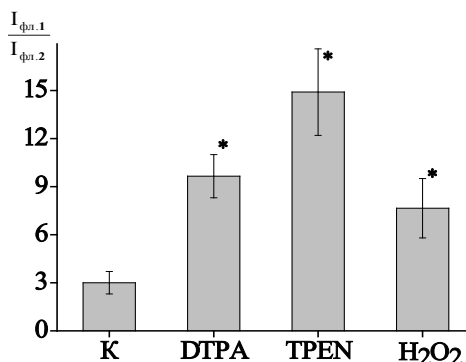
**Рисунок 1.** Модификация внутриклеточного пула лабильных ионов цинка в эритроцитах человека. Кинетика интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в эритроцитах при последующем добавлении в суспензию клеток внутриклеточного хелатора Zn<sup>2+</sup> TPEN (а) и внеклеточного хелатора Zn<sup>2+</sup> DTPA (б)



**Рисунок 2.** Кинетика интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах в зависимости от концентрации сульфата цинка в среде инкубации. За 100% принято значение интенсивности флуоресценции DCF ( $I_{фл.к}$ ) интактных клеток; 1 – эритроциты без воздействия сульфата цинка (контроль); 2, 3, 4 – эритроциты, подвергшиеся воздействию сульфата цинка в концентрациях 50; 100 и 500 мкМ, соответственно;  $\lambda_{возб.} = 505$  нм;  $\lambda_{рег} = 525$  нм

воздействию сульфата цинка в субгемолитических концентрациях. Как видно из рисунка 2, сульфат цинка в концентрации 50 мкМ не оказывает существенного влияния на образование свободнорадикальных соединений в этих клетках. Инкубация эритроцитов в среде, содержащей 100 и 500 мкМ сульфата цинка, приводит в течение первых 60–90 мин к снижению интенсивности флуоресценции DCF на 15–35% и 40–45%, соответственно, т.е. ионы цинка проявляют антиоксидантное действие, что хорошо согласуется с литературными данными [12]. При увеличении времени инкубации до 4 ч происходит возрастание свечения DCF на 10–20% и 20–45% по отношению к интактным эритроцитам, соответственно, т.е. ионы цинка оказывают прооксидантное действие. Таким образом, увеличение внутриклеточного пула лабильных  $Zn^{2+}$  в концентрациях свыше 100 нМ приводит к нарастанию уровня АФК в эритроцитах, т.е. дисбаланс прооксиданты/антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера запрограммированной гибели эритроцитов. Этот вывод также согласуется с обнаруженной нами обратной зависимостью между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активности эритроцитов при моделировании окислительного стресса, используя пероксид водорода и TPEN *in vitro*. Как было показано ранее, действие этих агентов сопровождаются ингибированием ферментов системы антиоксидантной защиты клетки (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза) и снижением уровня низкомолекулярного антиоксиданта – восстановленного глутатиона [13,14]. Однако остается открытым вопрос, что происходит после модификации цинкового гомеостаза с уровнем другого низкомолекулярного цистеинсодержащего белка – металлотионеина. Данный белок, как было описано в литературном обзоре, является основным депо цинка, т.е. регулирует метаболизм цинка, и совместно с восстановленным глутатионом участвует в поддержании клеточного редокс-состояния [4,15]. Более того, исходя из литературных данных, металлотионеины можно рассматривать как более эффективный антиоксидант по сравнению с другими системами, такими как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза [16].

Как видно из рисунка 3, при моделировании в эритроцитах человека окислительного стресса путем 30-минутного воздействия  $H_2O_2$  в максимально исследуемой концентрации 500 мкМ, также как и при моделировании Zn-дефицитного состояния, используя хелаторы цинка TPEN и DTPA в концентрации 50 мкМ происходит увеличение уровня содержания металлотионеинов в клетках в среднем в 3–5 раз.



**Рисунок 3.** Относительный уровень содержания металлотионеинов в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию хелаторов цинка TPEN и DTPA, а также пероксида водорода *in vitro*. К – контроль (инактивные эритроциты); DTPA и TPEN были использованы в концентрации 50 мкМ; пероксид водорода в концентрации 500 мкМ. \* – различия по сравнению с контролем достоверны ( $p < 0,05$ )

В тоже время, как было показано нами ранее [13,14], уровень восстановленного глутатиона критически снижается при воздействии пероксида водорода и хелатора ТРЕН, но не ДТРА. Полученные результаты подтверждают наше предположение о функционировании МТs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клетки и проявлении своих антиоксидантных свойств в условиях окислительного стресса, также как и в качестве регулятора метаболизма цинка, что видно на примере действия ДТРА.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о существовании в эритроцитах человека механизмов регуляции лабильного пула цинка и концентрационной грани между его “эссенциальными” и токсичными свойствами, нарушение которой может привести к запуску патологических процессов, что было продемонстрировано нами ранее на примере сахарного диабета II типа, где цинковый гомеостаз в этиопатогенезе данной патологии играет важную роль [17].

#### Список литературы / References:

1. Outten C.E., O'Halloran T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 2001, vol. 292, pp. 2488-2492. doi: 10.1126/science.1060331
2. Frederickson C.J., Suh S.W., Silva D., Frederickson C.J., Thompson R.B. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of Nutrition*, 2000, vol. 130, suppl 5S, pp.1471S-1483S. doi: 10.1093/jn/130.5.1471S
3. Haase H., Rink L. Zinc signals and immune function. *Biofactors*, 2014, vol. 40, pp. 27-40. doi: 10.1002/biof.1114
4. Eide D.J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1763, pp. 711-722. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.03.005
5. Beyersmann D., Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biomaterials*, 2001, vol. 14, pp. 331-341. doi: 10.1023/a:1012905406548
6. Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T., Kabu K., Sato E., Kurosaki T., Yamashita S., Tokunaga M., Nishida K., Hirano T. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J. Cell Biol*, 2007, vol. 177, no. 4, pp. 637-645. doi: 10.1083/jcb.200702081
7. McCabe M.J., Jiang S.A., Orrenius S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. *Lab. Invest*, 1993, vol. 69, no. 1, pp. 101-110. PMID: 8331893
8. Gee K.R., Zhou Z-L., Ton-That D., Sensi S.L., Weiss J.H. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*, 2002, vol. 31, no. 5, pp. 245-251. doi: 10.1016/S0143-4160(02)00053-2
9. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Determination of the Dynamics of Change in the Intracellular Pool of Zinc Ions in Human Erythrocytes Using a FluoZin-3 Fluorescent Probe. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2021, vol. 87, no. 6, pp. 1094-1099. doi: 10.1007/s10812-021-01114-6
10. Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J., Montreuil J. Novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*, 2005, vol. 66A, pp. 78-84. doi: 10.1002/cyto.a.20152
11. Hershinkel M. The Zinc Sensing Receptor, ZnR/GPR39, in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci*, 2018, vol. 19, no. 439, pp. 57-75. doi: 10.3390/ijms19020439
12. Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 264-275. doi: 10.1134/S0006350914020092
13. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Kanash Y.S., Zubritskaya G.P., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. The role of intracellular zinc in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 950-958. doi: 10.1134/S0006350916060087
14. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Zn-дефицитные состояния в эритроцитах человека *in vitro* и свободнорадикальные процессы. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*, 2017, № 3, с. 54-63. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V. Zn-deficient states in human erythrocytes *in vitro* and free radical processes. *J. Belarus. State Univ. Ecol*, 2017, vol. 3, pp. 54-63. (In Russ)]
15. Nordberg J., Arner E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med*, 2001, vol. 31, pp. 1287-1312. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00724-9
16. Sato M., Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J. Exp. Med*, 2002, vol. 196, pp. 9-22. doi: 10.1620/tjem.196.9
17. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. The role of metallothioneins in the maintenance of zinc homeostasis and state in erythrocytes of cardiologic patients with the metabolic disorders. *Journal of Integrated OMICS*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 10-16. doi: 10.5584/jiomics.v9i1.260

**OXIDATIVE STRESS IN THE INTRACELLULAR ZINC SIGNALING SYSTEM:  
IN VITRO INVESTIGATION ON HUMAN ERYTHROCYTES**

**Harmaza Y.M., Tamashevski A.V.**

Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies

*Minsk, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru*

**Abstract.** It was demonstrated the existence of specific receptors on the surface of red blood cells and intracellular stores responsible for maintaining zinc homeostasis using intracellular and extracellular zinc chelators – TPEN and DTPA. At the same time, it was shown that rise the cytosolic pool of labile  $Zn^{2+}$  over 100 nM leads to the initiation of apoptotic processes. The intracellular molecular mechanisms leading to  $Zn^{2+}$  release from cellular stores determine the cytotoxic zinc effects. Moreover, an inverse relationship between the intracellular labile zinc pool and esterase activity of red blood cells under modeling oxidative stress using  $H_2O_2$  *in vitro* was revealed. It indicates the direct participation of  $Zn^{2+}$  in triggering eryptosis and that “prooxidants/antioxidants” imbalance in favor of the former acts as a trigger of this process. At the same time, an increase in the expression level of cytosolic thiol-containing metallothioneins was detected, both in red blood cells depleted by  $Zn^{2+}$  and in cells after the oxidative stress induction. These indicate the functioning of metallothioneins as an adjuvant antioxidant in the protective system of red blood cells under oxidative stress.

**Key words:** *human erythrocytes, zinc homeostasis, labile zinc pool, esterase activity, metallothioneins, oxidative stress.*