

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СОСТОЯНИЯ ДЕФИЦИТА ИОНОВ ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В.

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru
Поступила в редакцию: 25.05.2018

Аннотация. Установлено, что инкубация эритроцитов человека с внутриклеточным хелатором – N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамином (TPEN), в субгемолитических концентрациях приводит к достоверному снижению внутриклеточного пула Zn^{2+} и увеличению эстеразной активности клеток. Продемонстрировано, что одним из возможных механизмов развития окислительного стресса в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка является ингибирование активности основных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы и изменение концентрации восстановленного глутатиона. Выявлено, что именно ингибирование фермента глутатионпероксидаза вносит вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка. Более того, обнаруженное усиление экспрессии цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro* подтверждает предположение о функционировании данных белков в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клеток.

Ключевые слова: эритроциты человека, дефицит цинка, редокс-статус, лабильный пул цинка, эстеразная активность, антиоксидантная система, металлотионеины

Известно, что цинк является единственным ионом среди переходных металлов, который не имеет биологической окислительно-восстановительной активности. Именно отсутствие редокс-активности наряду с его относительно сильным сродством к белкам позволили цинку стать подходящим ионом в качестве структурного кофактора [1]. Из 2800 белков, содержащих Zn-связывающие участки, более 800 являются ферментами, которые принадлежат ко всем классам – гидролазы, лигазы, трансферазы, оксидоредуктазы и лиазы/изомеразы (алкогольдегидрогеназа, Cu/Zn-СОД, карбоксипептидаза и др.) [2]. Также цинк является компонентом многих транскрипционных факторов, сигнальных белков, “цинковых пальцев” неизвестной функции [2]. Во всех металлоферментах цинк выполняет три основные функции: участие в каталитических процессах, поддержание структурной стабильности и регуляцию [3].

Распространенность цинка во внутриклеточном метаболизме указывает на то, что он принимает участие во многих жизненно важных процессах, а негативные последствия нарушения цинкового гомеостаза свидетельствуют о важности этого микроэлемента для организма. Первое концептуальное подтверждение появилось в 1961 году вместе с гипотезой, что дефицит цинка был главным фактором в пищевом синдроме, описанном в странах Среднего Востока [4]. В 1974 году в ходе фенотипической экспрессии редкого аутосомно-рецессивного наследственного заболевания – энтеропатического акродерматита, был обнаружен дефект в метаболизме цинка [5]. *ZIP4*, который кодирует белки-транспортёры ионов цинка ZIP/SLC39 и экспрессируется в кишечнике, был в дальнейшем идентифицирован как ген, ответственный за развитие этого заболевания. Этот факт явился генетическим доказательством того, что цинк, абсорбированный в кишечнике, имеет огромное физиологическое значение [6].

Так как дефицит цинка в организме человека чаще всего является проблемой питания и сопровождается многие хронические заболевания, было проведено большое количество исследований, в которых оценили влияние недостаточности цинка на функционирование иммунной системы, как на клеточном, так и на молекулярном уровнях [7]. Наиболее очевидной взаимосвязью между дефицитом ионов цинка и развитием заболеваний считается функция Zn^{2+} как антиоксиданта [8].

Проведенные исследования продемонстрировали, что дефицит цинка сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), но большинство из них были сфокусированы на недостатке этих ионов в клеточных культурах. Так, *Oteiza et al.* [9] показали, что рост клеточной линии мышей 3Т3 в условиях низкого содержания Zn^{2+} сопровождается усиленной продукцией АФК. Схожие результаты представлены в работе [10] – содержание АФК оказалось повышенным в Zn-дефицитных клетках глиомы крыс С6, что сопровождалось усиленным повреждением ДНК. Авторы заключили, что эффекты такого повреждения, вероятнее всего, являлись последствием потери ключевых ДНК-репарирующих механизмов. Гиперпродукция АФК и сопутствующие последствия (повреждение ДНК) были обнаружены и у экспериментальных животных в условиях Zn-дефицитной диеты [11]. При субоптимальной цинковой диете добровольцев также выявили схожие изменения [11]. Все Результаты исследований доказывают, что снижение концентрации ионов цинка в организме человека приводит к развитию окислительного стресса. Однако до сих пор первоначальный источник окислительного стресса при дефиците цинка остается неизвестным. Лишь в 2009 г. появились первые работы, выполненные на нейрональных клетках, в которых выдвинуто предположение, что одним из

возможных механизмов продукции АФК при Zn-дефицитном состоянии является повышение активности мембраносвязанного фермента NADPH-оксидазы [12, 13].

Цель работы – оценить редокс-статус эритроцитов человека (активность ключевых антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы и каталазы, содержание низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона и низкомолекулярных цистеин-содержащих белков металлотионеинов) при моделировании состояния дефицита ионов цинка в клетках *in vitro* и выяснить возможные пути развития окислительного стресса при этих условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров, полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" МЗ РБ. В качестве консерванта был использован гепарин.

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500g в течение 15 мин и трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl (155 мМ). Инкубацию эритроцитов (0,1 %-ый гематокрит) с внутриклеточным хелатором цинка – N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамин (TPEN) и внеклеточным хелатором – диэтилен тридаминпентауксусная кислота (DTPA) в концентрациях 10–100 мкМ проводили при 37°C в течение 30 или 60 мин в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,155 мМ NaCl.

Оценку внутриклеточной концентрации лабильного пула ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM [14]. За 100 % принимали значения интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах.

Внутриклеточную эстеразную активность оценивали с использованием флуоресцирующего красителя кальцеина-AM согласно методу [15]. За 100 % принимали значения интенсивности флуоресценции кальцеина в интактных эритроцитах.

Содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов антиоксидантной защиты: глутатионпероксидазы и каталазы определяли спектрофотометрически по методам [16-18] соответственно.

Оценку содержания металлотионеинов в эритроцитах проводили с помощью моноклональных антител UC1MT (Abcam), а в качестве изотипического контроля был использован IgG1 [19].

Флуоресцентные измерения проводились на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson), а фотометрические на спектрофотометре M40 (Specord, Германия).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. В работе представлены средние значения 4-6 независимых экспериментов в виде $\bar{x}_{cp} \pm S_x$, где \bar{x}_{cp} – среднее значение, S_x – стандартное отклонение. Достоверными (*) считали различия по сравнению с интактными эритроцитами (контроль) при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для моделирования Zn-дефицитного состояния в эритроцитах человека *in vitro* были выбраны хелаторы двух типов: мембранопроницаемый (внутриклеточный) хелатор TPEN, который обладает высокой аффинностью к ионам цинка (Zn^{2+}) ($3,8 \cdot 10^{15} M^{-1}$) и мембранонепроницаемый (внеклеточный) хелатор – DTPA. Специфичность TPEN к ионам цинка была продемонстрирована ранее на различных клетках и клеточных культурах путем изучения конкуренции с экзогенным Zn^{2+} и другими двухвалентными металлами [20].

Оценка изменения цитозольной концентрации лабильного пула цинка в эритроцитах человека после инкубации с внутриклеточным хелатором TPEN в концентрациях 10, 25, 50 и 100 мкМ выявила статистически достоверное дозозависимое его снижение (рис. 1А). Полученный эффект зависел также от времени инкубации с TPEN – если после 30-минутного выдерживания эритроцитов с хелатором внутриклеточное содержание Zn^{2+} снижалось в среднем на 10-50 %, то после 60 мин – на 15-85 %, по отношению к контрольным клеткам (клетки, нагруженные FluoZin-3-AM, но не обработанные TPEN) (рис. 1А). При проведении сравнительного анализа хелатирующего эффекта TPEN и DTPA выявлены существенные различия в степени снижения внутриклеточного пула цинка (рисунок 1Б). Если 30-минутная инкубация эритроцитов с TPEN в концентрации 10 мкМ приводила к снижению цитозольного содержания Zn^{2+} в среднем на 5-10 %, то эффект DTPA в той же концентрации составлял не более 4 %; 25 мкМ TPEN вызывало 10-14 % истощение внутриклеточного Zn^{2+} , а 25 мкМ DTPA – 5-7 %; 50 мкМ TPEN – снижало уровень Zn^{2+} на 20-27 %, а 50 мкМ DTPA – на 10-15 %; 100 мкМ TPEN – снижало уровень Zn^{2+} на 40-50 %, а 100 мкМ DTPA – на 22-30 %.

Ранее нами было показано [21], что при добавлении внеклеточного хелатора DTPA к суспензии эритроцитов, предварительно нагруженных флуоресцентным красителем FluoZin-3, происходит нарастание интенсивности его флуоресценции, что свидетельствует об увеличении цитозольной концентрации лабильных ионов цинка, т.е. при добавлении мембранонепроницаемого хелатора, который связывает эти ионы на поверхности мембраны, происходит высвобождение Zn^{2+} из клеточных депо для восполнения его недостатка на мембране и лишь на 20 мин инкубации наблюдалось плавное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3. А при добавлении внутриклеточного хелатора TPEN к суспензии эритроцитов происходило резкое скачкообразное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 до базального уровня, что свидетельствует о необратимом истощении эритроцитов по Zn^{2+} .

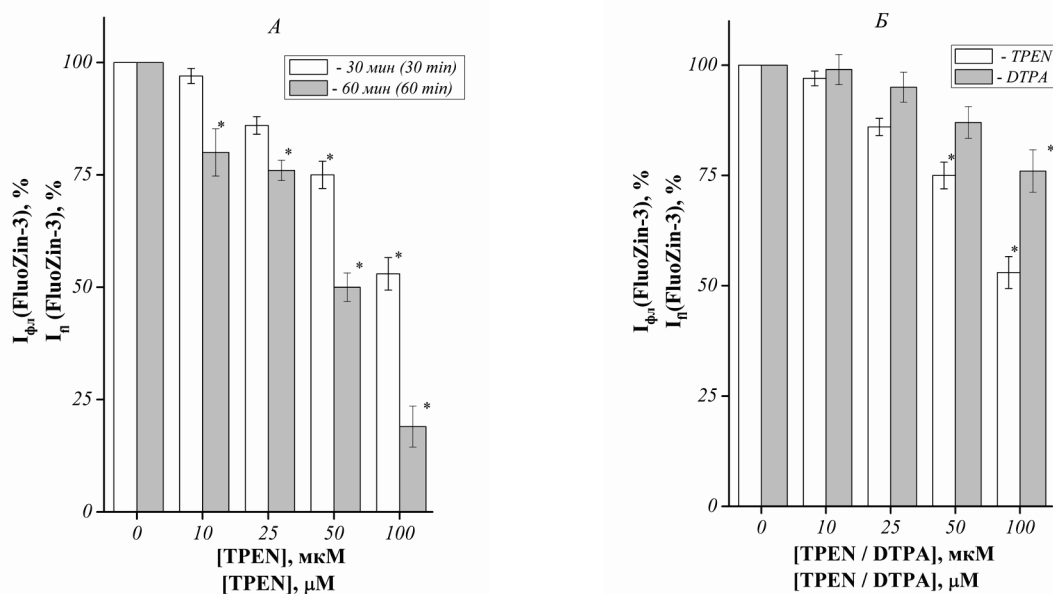


Рисунок 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от типа хелатора, его концентрации и времени экспозиции с эритроцитами человека (А, Б)

Таким образом, полученные результаты подтверждают сформулированное нами ранее предположение, что на поверхности эритроцитов находятся специфические рецепторы, отвечающие за поддержание цинкового гомеостаза.

Параллельно была проведена оценка эстеразной активности эритроцитов человека (маркера их жизнеспособности) с помощью высоколипофильного красителя кальцеина АМ, который быстро проникает сквозь клеточную мембрану и подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами до флуоресцирующего кальцеина [15, 22]. Инкубация клеток с внутриклеточным хелатором TPEN в концентрациях 10-100 мкМ в течение 30 минут позволила обнаружить статистически достоверное дозозависимое увеличение интенсивности флуоресценции зонда в среднем на 20-75 % (рис. 2). При этом, как было показано ранее, внутриклеточное содержание лабильного пула цинка снижалось на 10-50 % (рис. 1А, Б). Однако, при воздействии на эритроциты мембранонепроницаемого хелатора DTPA в таких же концентрациях, что приводит к снижению внутриклеточного пула лабильного цинка до 20-25 %, не обнаружено достоверного изменения активности эритроцитарных эстераз по отношению к интактным клеткам (рисунком 2). Проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную зависимость между внутриклеточным содержанием лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активностью эритроцитов, подвергшихся воздействию мембранопроницаемого хелатора TPEN (коэффициент Спирмена, $r_s = -0,866$, $p = 0,049$), а в условиях моделирования Zn-дефицитного состояния в клетках *in vitro* путем воздействия DTPA не наблюдалось достоверных зависимостей.

В работе [22] нами было продемонстрировано, что увеличение цитозольного пула лабильного Zn^{2+} свыше 100 нМ приводит к ингибированию цитозольной эстеразной активности эритроцитов, что свидетельствует о ранних стадиях процесса запрограммированной гибели (эриптоза). Более того, нами была выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активностью эритроцитов при моделировании окислительного стресса, используя пероксид водорода *in vitro* [23], что свидетельствует о прямом участии Zn^{2+} в запуске эриптоза и о том, что дисбаланс “прооксиданты / антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера данного процесса. На основании вышеизложенных результатов мы сделали предположение, что статус ионов цинка в эритроцитах человека может напрямую определяться активностью ключевых ферментов системы антиоксидантной защиты клетки (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза), а также содержанием низкомолекулярного антиоксиданта – восстановленного глутатиона, и низкомолекулярных цитозольных белков – металлотионеинов.

Известно, что наиболее важным элементом системы глутатиона является фермент глутатионпероксидаза, которому принадлежит основная роль в утилизации липидных гидроперекисей и пероксида водорода. Результаты проведенных нами исследований по определению активности данного фермента в эритроцитах человека в условиях моделирования дефицита цинка выявили статистически значимое снижение его активности, как при внутриклеточном хелатировании цинка, так и при использовании мембранонепроницаемого хелатора DTPA (рис. 3А). При внутриклеточном хелатировании максимальный эффект наблюдался при действии TPEN в концентрации 25 мкМ – ингибирование фермента в среднем на 50-60 %, тогда как при действии TPEN в концентрациях 50 и 100 мкМ – 30-45 % (рис. 3А).

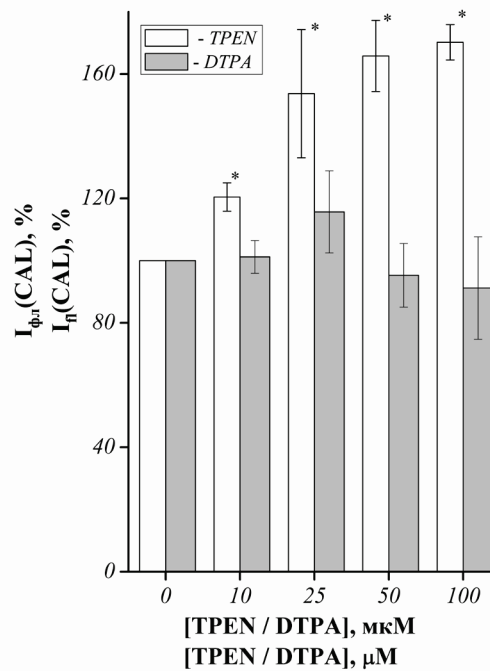


Рисунок 2. Интенсивность флуоресценции кальцеина в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию хелаторов ионов цинка: TPEN и DTPA

При внеклеточном хелатировании данного микроэлемента происходило более выраженное ингибирование активности глутатионпероксидазы – максимальный эффект наблюдался при воздействии DTPA в концентрации 100 мкМ – 60-70 %-ое снижение активности фермента, тогда как действие 10-50 мкМ DTPA снижало активность фермента в среднем на 30-50% (рис. 3А).

При этом, активность каталазы – функция, которой также заключается в утилизации пероксида водорода, была также снижена, как при действии TPEN, так и при действии DTPA, но в меньшей степени (рисунок 3Б). Инкубация эритроцитов в течение 30 мин с TPEN в концентрациях 10-100 мкМ вызывала 20-35 % ингибирование каталазы, а с DTPA в тех же концентрациях – 10-35 % снижение активности фермента (рис. 3Б). Более того, не было обнаружено концентрационной зависимости ингибирования данного фермента. Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что в эритроцитах при высокой скорости образования пероксида водорода преобладает каталазная активность, а при низкой скорости образования H_2O_2 – пероксидазная [23].

Оценка концентрации восстановленного глутатиона – главного антиоксиданта эритроцитов, выявила разнонаправленное изменение ее содержания в эритроцитах в зависимости от концентрации TPEN, находящегося в среде инкубации клеток (рис. 4А, Б). Если воздействие TPEN в концентрациях 10 и 25 мкМ приводило к незначительному снижению, то инкубация клеток с 50 мкМ – к статистически значимому увеличению содержания GSH в среднем на 10 %. В то же время 60-минутная инкубация эритроцитов с TPEN вызывала достоверное дозозависимое снижение концентрации GSH. При этом инкубация клеток с мембранонепроницаемым хелатором цинка DTPA в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ не приводила к значительному изменению концентрации исследуемого показателя, но, в то же время, воздействие DTPA в концентрации 25 мкМ сопровождалось увеличением концентрации GSH на 8-10 % при 30-минутной и на 20-25 % при 60-минутной инкубации (рис. 4Б). Объяснением этого факта может явиться продемонстрированный нами ранее механизм действия мембранонепроницаемого хелатора цинка – а именно рецепторный запуск высвобождения ионов цинка из депо клетки из-за их хелатирования на поверхности мембраны [21]. Более того, как было показано нами в работе [23], инкубация эритроцитов с хлоридом цинка в концентрации 50 мкМ в течение 30 мин приводит к увеличению уровня восстановленного глутатиона в среднем на 10 %.

Проведенный корреляционный анализ выявил обратные зависимости между уровнем внутриклеточного пула лабильного цинка и содержанием восстановленного глутатиона в эритроцитах, подвергшихся 30-минутному воздействию внутриклеточного и мембранного хелаторов Zn^{2+} (коэффициент Спирмена, $r_{s1} = -0,809$; $r_{s2} = -0,417$, соответственно после инкубации с TPEN и DTPA).

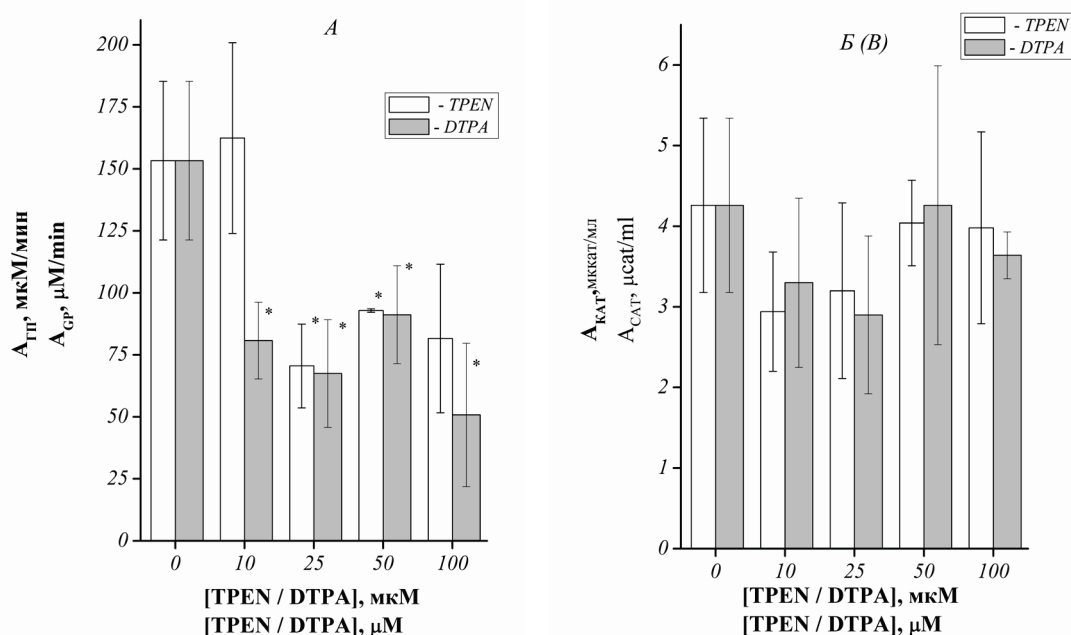


Рисунок 3. Активность глутатионпероксидазы (А) и каталазы (Б) в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию внутриклеточного хелатора TPEN и внеклеточного хелатора DTPA

Однако при увеличении времени воздействия TPEN на эритроциты до 60 мин мы наблюдали положительную статистически значимую корреляцию (коэффициент Спирмена $r_s = 0,996$, $p = 0,004$). Положительные корреляции были выявлены также между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и активностью глутатионпероксидазы (коэффициент Спирмена, $r_{s1} = 0,723$, $r_{s2} = 0,63$, соответственно после 30-минутной инкубации с TPEN и DTPA). В то же время между изменением внутриклеточного содержания лабильного пула цинка в эритроцитах после воздействия TPEN / DTPA и активностью каталазы зависимости выявлено не было. Однако, была установлена достоверная обратная взаимосвязь между эстеразной активностью эритроцитов и активностью глутатионпероксидазы при истощении в клетках ионов цинка, используя хелатор TPEN (коэффициент Спирмена $r_s = -0,888$, $p = 0,044$).

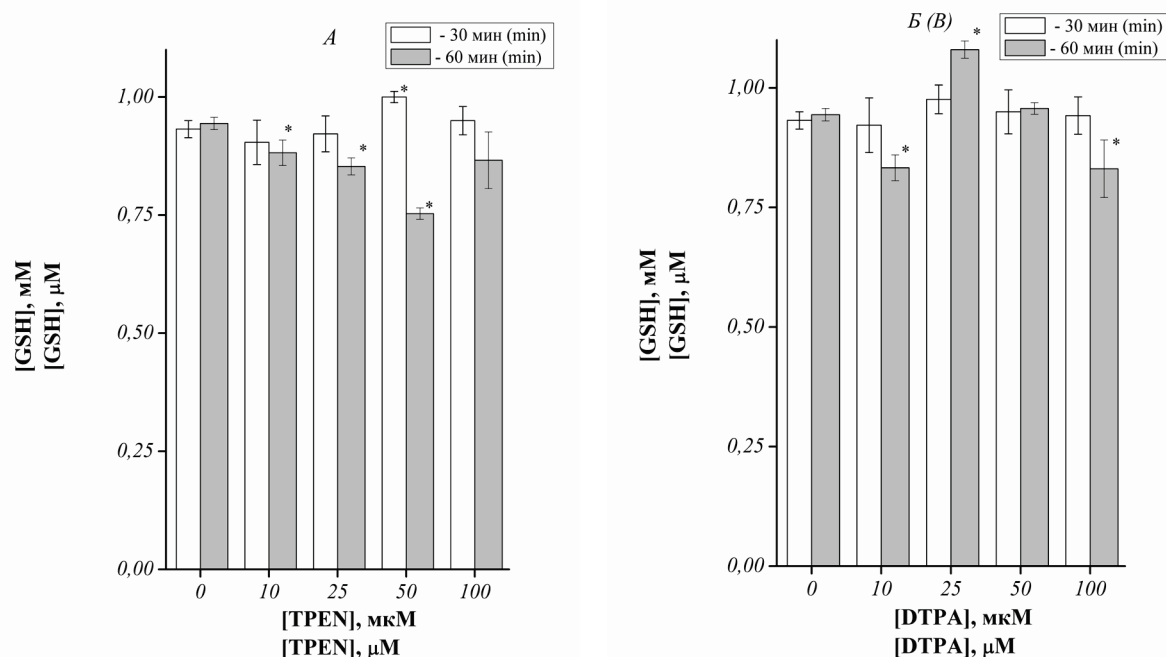


Рисунок 4. Зависимость содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах человека от концентрации и времени экспозиции с хелаторами цинка TPEN (А) и DTPA (Б)

Исходя из этих результатов, мы заключили, что критическое снижение активности именно этого фермента вносит значительный вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка, но сам механизм запуска этого процесса до сих пор не выявлен.

Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу, что одним из возможных механизмов развития окислительного стресса в клетках при Zn-дефицитном состоянии может являться ингибирование основных ферментов антиоксидантной защиты и изменение уровня восстановленного глутатиона, что свидетельствует о модификации внутриклеточных тиольных групп. Известно, что наряду с GSH в поддержании клеточного редокс-состояния принимают участие металлотионеины (MTs, суперсемейство неэнзиматических полипептидов, которые характеризуются небольшой молекулярной массой, характерным аминокислотным составом (большим содержанием цистеина) и высоким содержанием серы и металлов (тиолатные кластеры металлов) [24]), которые могут функционировать в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клетки и проявлять свои антиоксидантные свойства только в экстремальных условиях окислительного стресса [25]. В ряде статей, посвященных исследованию взаимосвязи MTs с регуляцией клеточного цикла и пролиферацией, был продемонстрирован контроль ими внутриклеточного уровня Zn^{2+} [26] и показано, что они регулируют цитозольный пул ионов цинка путем высвобождения и передачи их другим металлопротеинам и транскрипционным факторам [27]. При этом MTs являются маркерами окислительного стресса, как на уровне мРНК, так и на белковом уровне.

Исходя из вышеизложенного, мы изучили экспрессию цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка, смоделированного *in vitro* путем инкубации эритроцитов человека с хелаторами данного микроэлемента TPEN и DTPA в концентрации 50 мкМ.

Как видно из рисунка 5, после 60-минутного воздействия DTPA в концентрации 50 мкМ происходит увеличение экспрессии металлотионеинов в эритроцитах в среднем на 10-20 %, а инкубация эритроцитов с внутриклеточным хелатором TPEN при тех же условиях приводит к увеличению экспрессии данного белка на 20-30 %, по сравнению с интактными клетками. Как было показано выше, уровень GSH в данных условиях (60-минутная инкубация) при воздействии TPEN достоверно снижается с 0,95 мМ – значение, характерное для интактных эритроцитов, до 0,75 мМ (рис. 4А), но в то же время, воздействие мембранного хелатора DTPA не оказывало заметного ингибирующего действия на уровень GSH в эритроцитах (рис. 4Б).

Полученные результаты, с одной стороны, подтверждают предположение о функционировании MTs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клетки и проявлении своих антиоксидантных свойств в условиях окислительного стресса [23, 24], но, с другой стороны, не согласуются с гипотезой о снижении экспрессии MTs в условиях дефицита цинка, выдвинутой в работе [28].

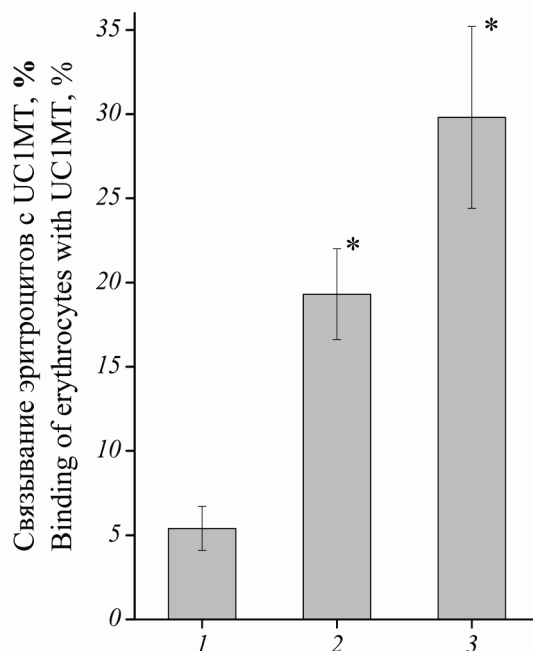


Рисунок 5. Процент связывания антител UC1MT с металлотионеинами в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro*.

1 – интактные эритроциты;

2 – эритроциты, обработанные DTPA в концентрации 50 мкМ;

3 – эритроциты, обработанные TPEN в концентрации 50 мкМ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что моделирование Zn-дефицитного состояния в эритроцитах человека с помощью внутриклеточного хелатора TPEN в субгемолитических концентрациях приводит к достоверному снижению внутриклеточного пула Zn^{2+} и увеличению эстеразной активности клеток, что не наблюдалось при истощении ионов цинка с помощью внеклеточного хелатора ДТРА.

Впервые продемонстрировано, что одним из возможных механизмов развития окислительного стресса в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка является ингибирование активности основных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы, на фоне разнонаправленного изменения уровня восстановленного глутатиона. Выявлено, что именно снижение активности глутатионпероксидазы вносит вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка.

Более того, обнаружено увеличение экспрессии цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro*, что подтверждает предположение о функционировании МТs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клеток.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б14М-066.

Список литературы / References:

1. Maret W., Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem. Rev.*, 2009, vol. 109, pp. 4682-4707.
2. Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome. Res.*, 2006, vol. 5, no. 1, pp. 196-201.
3. Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты. Биофизика, 2014, т. 59, вып. 2, с. 322-337. [Garmaza Yu.M., Slobozhanina E.I. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects. *Biophysics*, vol. 59, iss. 2, pp. 322-337. (In Russ.)]
4. Prasad A.S., Halsted J.A., Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am. J. Med.*, 1961. vol. 31, pp. 532-546.
5. Moynahan E.J. Letter: Acrodermatitis enteropathica: A lethal inherited human zinc-deficiency disorder. *Lancet*, 1974, vol. 2, pp. 399-400.
6. Wang K., Zhou B., Kuo Y.M., Zemansky J., Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, vol. 71, pp. 66-73.
7. Prasad A.S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014, vol. 28, no. 4, pp. 357-363.
8. Zago M.P., Oteiza P.I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, vol. 31, no. 2, pp. 266-274.
9. Oteiza P.I., Clegg M.S., Zago M.P., Keen C.L. Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biol. Med.*, 2000, vol. 28, pp. 1091-1099.
10. Ho E., Ames B.N. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NfκB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, vol. 99, pp. 16770-16775.
11. Song Y., Leonard S.W., Traber M.G., Ho E. Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J. Nutr.*, 2009, vol. 139, pp. 1626-1631.
12. Brennan A.M., Suh S.W., Won S.J., Narasimhan P., Kauppinen T.M., Lee H., Edling Y., Chan P.H., Swanson R.A. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.*, 2009, vol. 12, pp. 857-863.
13. Paoletti A.M., Vergnano A.M., Barbour B., Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 2009, vol. 158, pp. 126-136.
14. 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.
15. Bratosin D., Mitrofan L., Palli C., Estaquier J. Novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*, 2005, vol. 66A, pp. 78-84.
16. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.*, 1959, vol. 82, no. 1, pp. 70-77.
17. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. Дело*, 1986, № 12, с. 724-727. [Moin V.M. A simple and specific method for determining of the glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Laboratory diagnostics*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ)]
18. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е. Метод определения каталазной активности. *Лаб. дело*, 1988. № 1. с. 16-19. [Koroluk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokareva V.E. Method for the determination of catalase activity [Metod opredeleniya katalaznoy aktivnosti]. *Laboratory diagnostics*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (in Russ)]
19. *Anti-Metallothionein antibody [UC1MT]*. 04.10.2015, URL: abcam.com/metallothionein-antibody-uc1mt-ab12228.html.
20. McCabe M.J., Jiang S.A., Orrenius S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. *Lab. Invest.*, 1993, vol. 69, pp. 101-110.

21. Harmaza Y., Slobozhanina E. Zinc homeostasis and eryptosis. *FEBS J.*, 2013, vol. 280, suppl. 1, p. 218.
22. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Гончарова Н.В., Слобожанина Е.И. Влияние внутриклеточного уровня цинка в эритроцитах человека на перераспределение фосфатидилсерина и их жизнеспособность. *Новости медико-биологических наук*, 2011, т. 3, № 1, с. 90-95. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Goncharova N.V., Slobozhanina E.I. Influence of intracellular level of zinc in human erythrocytes on the redistribution of phosphatidylserine and their viability. *News of biomedical sciences*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 90-95. (in Russ)]
23. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Канаш Ю.С., Зубрицкая Г.П., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И. Внутриклеточный цинк: роль в H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека. *Биофизика*, 2016, т. 61, вып. 6, с. 1149-1158. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Kanash J.S., Zubritskaya G.P., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. Intracellular Zinc: a Role in H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61, iss. 6, pp. 1149-1158. (in Russ)]
24. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль. Известия НАН Беларуси. *Серия биол. наук*, 2016, no. 1, с. 107-116. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Mammalian metallothioneins: structure and biological role. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus*, 2016, no. 1, pp. 107-116. (in Russ.)]
25. Min K.S., Tanaka N., Horie T., Kawano H., Tetsuchikawahara N., Onosaka S. Metallothionein-enriched hepatocytes are resistant to ferric nitriloacetate toxicity during conditions of glutathione depletion. *Toxicol. Lett.*, 2005, vol. 158, pp. 108-115.
26. Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr. Med. Chem.*, 2011, vol. 18, pp. 5041-5051.
27. Formigari A., Santon A., Irato P. Efficacy of zinc treatment against iron-induced toxicity in rat hepatoma cell line H4-II-E-C3. *Liver Int.*, 2007, vol. 27, pp. 120-127.
28. Eide D.J. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics*, 2011, vol. 3, pp. 1124-1129.

MECHANISMS OF THE OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT UNDER ZINC IONS DEFICIENT STATE MODELING IN HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO*

Harmaza Y.M., Tamashevski A.V.

*Institute of biophysics and cell engineering of National academy of sciences of Belarus
Akademicheskaya st., 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru*

Abstract. It was established that incubation of human erythrocytes with an intracellular chelator N',N'-tetrakis(2-methyl-pyridyl)ethylenediamine (TPEN) in subhemolytic concentrations leads to a significant decrease in the Zn²⁺ intracellular pool and cells esterase activity rise. It was demonstrated that one of the possible mechanisms of an oxidative stress development in zinc deficient human erythrocytes is the inhibition of the main antioxidant enzymes activity – catalase and glutathione peroxidase as well as changes in the reduced glutathione concentration. It was found that decreased glutathione peroxidase activity exactly contributes to the erythrocyte esterases activation under zinc ions deficiency. An increased expression of the cysteine-rich proteins metallothioneins in human erythrocytes under simulation of the Zn-deficient state *in vitro* was revealed. It confirms the hypothesis about the functioning of these proteins as an auxiliary antioxidant in a protective cell system.

Key words: human erythrocytes, zinc deficiency, redox-state, zinc labile pool, esterase activity, antioxidant system, metallothioneins