

УДК 577.3'32/36;577.334

### Zn-ДЕФИЦИТНЫЕ СОСТОЯНИЕ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Ю. М. ГАРМАЗА<sup>1)</sup>, А. В. ТАМАШЕВСКИЙ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,  
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

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<sup>2+</sup> 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 глутатионпероксидазы вносит вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка. 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.

---

#### Образец цитирования:

Гармаза Ю. М., Тамашевский А. В. Zn-дефицитные состояние в эритроцитах человека *in vitro* и свободнорадикальные процессы // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2017. № 1. С. 54–63.

#### For citation:

Harmaza Yu. M., Tamashevski A. V. Zn-deficient states in human erythrocytes *in vitro* and free radical processes. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2017. No. 1. P. 55–63 (in Russ.).

---

#### Авторы:

**Юлия Михайловна Гармаза** – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории медицинской биофизики.

**Александр Владимирович Тамашевский** – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории медицинской биофизики.

#### Authors:

**Yuliya M. Harmaza**, PhD (biological); senior researcher of the laboratory of medical biophysics.

*garmaza@yandex.ru*

**Alexander V. Tamashevski**, PhD (biological); senior researcher of the laboratory of medical biophysics.

*tayzoe@mail.ru*

---

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

Авторы выражают благодарность научному сотруднику, кандидату биологических наук Г. П. Зубрицкой и младшему научному сотруднику А. Г. Кутько в проведении исследований по оценке активности ферментов системы антиоксидантной защиты эритроцитов.

## Zn-DEFICIENT STATES IN HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO* AND FREE RADICAL PROCESSES

Y. M. HARMAZA<sup>a</sup>, A. V. TAMASHEVSKI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of biophysics and cell engineering of National academy of sciences of Belarus,  
Akademicheskaya street, 27, 220072, Minsk, Belarus*

*Corresponding author: garmaza@yandex.ru*

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 Zn<sup>2+</sup> 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.

**Acknowledgements.** The article is prepared with the support of Belarusian Republican Foundation for fundamental research, grant Б14М–066.

The authors are grateful to a researcher, PhD (biology) Zubritskaya G. P. and a junior researcher Kutko A. G. for conduction of researches on evaluation of enzyme activity of the system of antioxidant erythrocyte protection.

### Введение

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 г. вместе с гипотезой, что дефицит цинка был главным фактором в пищевом синдроме, описанном в странах Среднего Востока [4]. В 1974 г. 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 данного 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, ученые [9] свидетельствуют, 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. 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 исследования

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров, полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В качестве консерванта был использован гепарин.

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500 g в течение 15 мин и трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl (155 mM). Инкубацию эритроцитов (0,1%-ый гематокрит) с внутриклеточным хелатором цинка – N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамин (TPEN) и внеклеточным хелатором – диэтилен тридиаминпентауксусная кислота (ДТРА) в концентрациях 10–100 мкМ проводили при 37 °C в течение 30 или 60 мин в 10 mM трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,155 mM 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 (Abscam), 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  $x_{cp} \pm s_x$ , где  $x_{cp}$  – среднее значение,  $s_x$  – стандартное отклонение. Достоверными (\*) считали различия по сравнению с интактными эритроцитами (контроль) при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

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 –

ДТРА. Специфичность ТРЕН 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 ТРЕН в концентрациях 10, 25, 50 и 100 мкМ выявила статистически достоверное дозозависимое его снижение (рис. 1, а). Полученный эффект зависел также от времени инкубации с ТРЕН – 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-АМ, но не обработанные ТРЕН) (рис. 1а). При проведении сравнительного анализа хелатирующего эффекта ТРЕН и ДТРА выявлены существенные различия в степени снижения внутриклеточного пула цинка (рис. 1, б). Если 30-минутная инкубация эритроцитов с ТРЕН в концентрации 10 мкМ приводила к снижению цитозольного содержания  $Zn^{2+}$  в среднем на 5–10 %, то эффект ДТРА в той же концентрации составлял не более 4 %; 25 мкМ ТРЕН вызывало 10–14 % истощение внутриклеточного  $Zn^{2+}$ , а 25 мкМ ДТРА – 5–7 %; 50 мкМ ТРЕН снижало уровень  $Zn^{2+}$  на 20–27 %, а 50 мкМ ДТРА – на 10–15 %; 100 мкМ ТРЕН снижало уровень  $Zn^{2+}$  на 40–50 %, а 100 мкМ ДТРА – на 22–30 %.

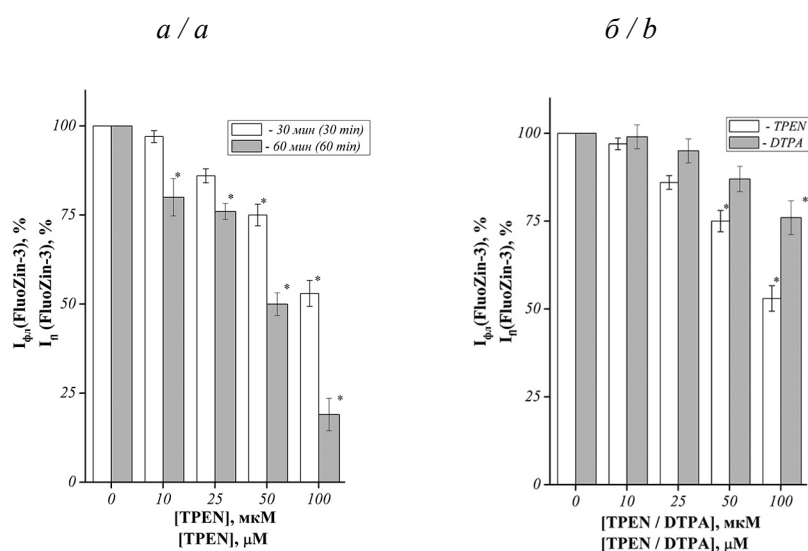


Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от типа хелатора, его концентрации и времени экспозиции с эритроцитами человека

Fig. 1. Dependence of the relative intensity of FluoZin-3 fluorescence from the chelator type, its concentration and exposure time with human erythrocytes

Ранее нами было показано [21], что при добавлении внеклеточного хелатора ДТРА к суспензии эритроцитов, предварительно нагруженных флуоресцентным красителем FluoZin-3, происходит нарастание интенсивности его флуоресценции, что свидетельствует об увеличении цитозольной концентрации лабильных ионов цинка, то есть 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 ТРЕН к суспензии эритроцитов происходило резкое скачкообразное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 до базального уровня, что свидетельствует о необратимом истощении эритроцитов по  $Zn^{2+}$ . 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 ТРЕН в концентрациях 10–100 мкМ в течение 30 мин 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. 1, а, б). Однако при воздействии на эритроциты мембранонепроницаемого хелатора ДТРА 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 (рис. 2). Проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную зависимость между внутриклеточным содержанием лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активностью эритроцитов, подвергшихся воздействию мембранопроницаемого хелатора ТРЕН (коэффициент Спирмена,  $r_s = -0,866$ ,  $p = 0,049$ ), а в условиях моделирования Zn-дефицитного состояния в клетках *in vitro* путем воздействия ДТРА 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). Кроме того, нами была выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активности 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.

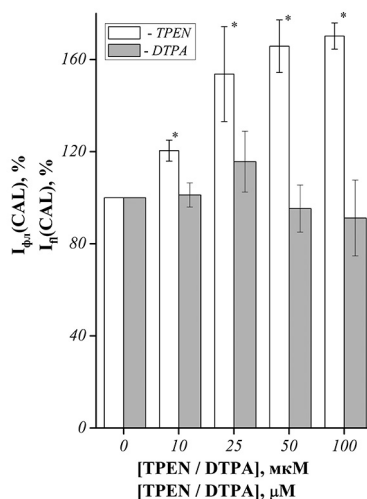


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции кальцеина в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию хелаторов ионов цинка: ТРЕН и ДТРА

Fig. 2. Intensity of calcein fluorescence in human erythrocytes exposed to the chelating agents of zinc ions: TPEN and DTPA

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 ДТРА (рис. 3, а). При внутриклеточном хелатировании максимальный эффект наблюдался при действии ТРЕН в концентрации 25 мкМ – ингибирование фермента в среднем на 50–60 %, тогда как при действии ТРЕН в концентрациях 50 и 100 мкМ – 30–45 % (рис. 3, а). При внеклеточном хелатировании данного микроэлемента происходило более выраженное ингибирование активности глутатионпероксидазы – максимальный эффект наблюдался при воздействии ДТРА в концентрации 100 мкМ – 60–70 %-ое снижение активности фермента, тогда как действие 10–50 мкМ ДТРА снижало активность фермента в среднем на 30–50 % (рис. 3, а). При этом, активность каталазы – функция, которой также заключается в утилизации пероксида водорода, была также снижена как при действии ТРЕН, так и при действии ДТРА, но в меньшей степени (рис. 3, б). Инкубация эритроцитов в течение 30 мин с ТРЕН в концентрациях 10–100 мкМ вызывала 20–35 % ингибирование каталазы, а с ДТРА в тех же концентрациях – 10–35 % снижение активности фермента (рис. 3, б). 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. 4, а, 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. 4, б). 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]. 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 %.

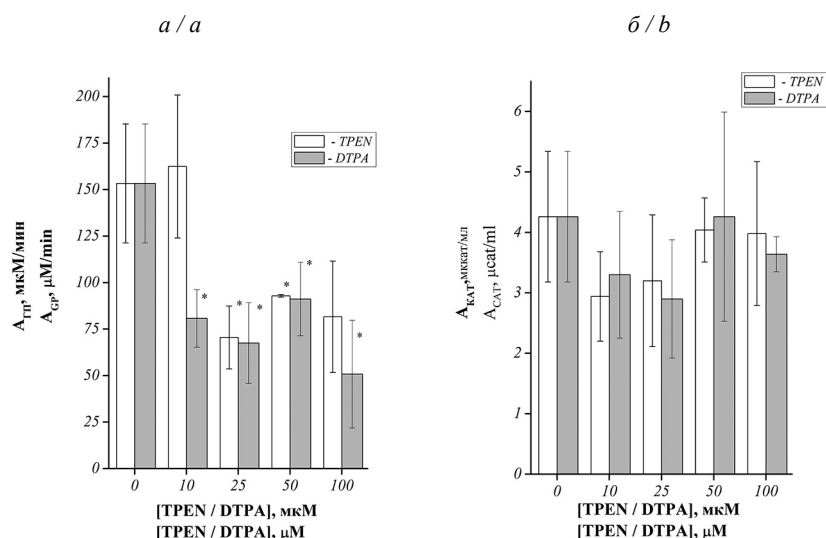


Рис. 3. Активность глутатионпероксидазы (а) и каталазы (б) в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию внутриклеточного хелатора TPEN и внеклеточного хелатора DTPA

Fig. 3. The activity of glutathione peroxidase (a) and catalase (b) in human erythrocytes exposed to the intracellular chelator TPEN and extracellular chelator DTPA

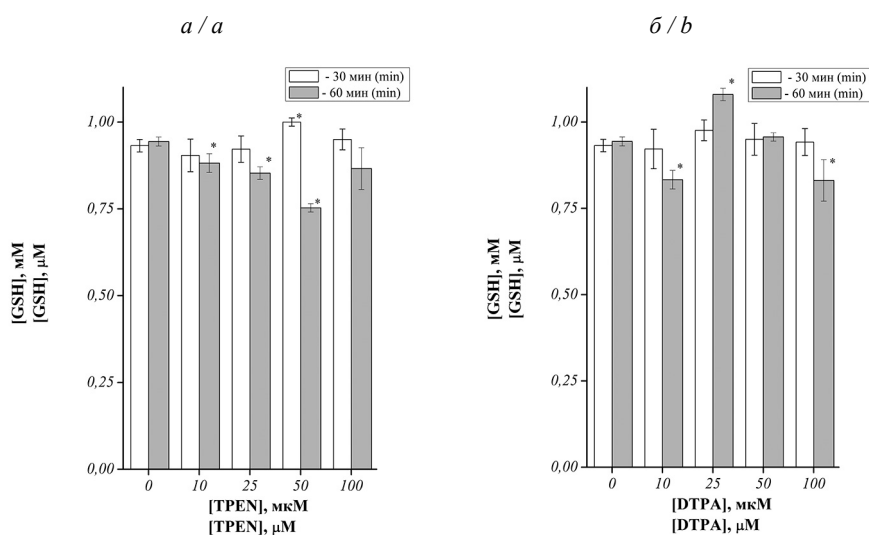


Рис. 4. Зависимость содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах человека от концентрации и времени экспозиции с хелаторами цинка TPEN (а) и DTPA (б)

Fig. 4. Dependence of the reduced glutathione level in human erythrocytes from the concentration and exposure time with zinc chelators TPEN (a) and DTPA (b)

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). 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  $r_s = -0,888$ ,  $p = 0,044$ ). 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, обусловленные небольшой молекулярной массой, характерным аминокислотным составом (большим содержанием цистеина) и высоким содержанием серы и металлов (тиолатные кластеры металлов) [24]. Они 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 следует из рис. 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. Следовательно, 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. 4, а), но в то же время, воздействие мембранного хелатора DTPA не оказывало заметного ингибирующего действия на уровень GSH в эритроцитах (рис. 4, б).

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].

### 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 DTPA (рис. 5).

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.

Обнаружено увеличение экспрессии цистеин-обогащенных белков металлотioneинов в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro*, что подтверждает предположение о функционировании MTs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клеток.

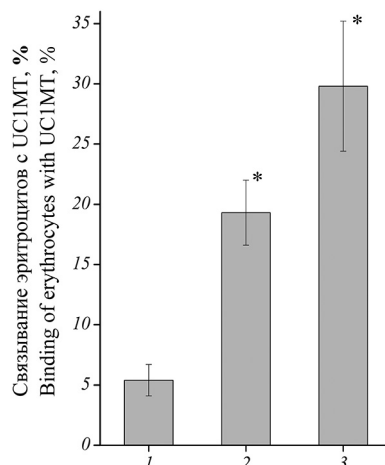


Рис. 5. Процент связывания антител UC1MT с металлотioneинами в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro*

1 – интактные эритроциты; 2 – эритроциты, обработанные DTPA в концентрации 50 мкМ; 3 – эритроциты, обработанные TPEN в концентрации 50 мкМ

Fig. 5. Percentage of UC1MT antibodies binding to metallothioneins in human erythrocytes under simulation of the Zn-deficient state *in vitro*

1 – intact erythrocytes; 2 – erythrocytes treated with 50 μM DTPA; 3 – erythrocytes treated with 50 μM TPEN

## Библиографические ссылки

- Maret W., Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins // Chem. Rev. 2009. Vol. 109. P. 4682–4707.
- Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome // J. Proteome. Res. 2006. Vol. 5, № 1. P. 196–201.
- Гармаза Ю. М., Слобожанина Е. И. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты // Биофизика. 2014. Т. 59, вып. 2. С. 322–337.
- Prasad A. S., Halsted J. A., Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia // Am. J. Med. 1961. Vol. 31. P. 532–546.
- Moynahan E. J. Letter: Acrodermatitis enteropathica: A lethal inherited human zinc-deficiency disorder // Lancet. 1974. Vol. 2. P. 399–400.
- Wang K., Zhou B., Kuo Y. M., et al. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica // Am. J. Hum. Genet. 2002. Vol. 71. P. 66–73.
- Prasad A. S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health // J. Trace Elem. Med. Biol. 2014. Vol. 28, № 4. P. 357–363.
- Zago M. P., Oteiza P. I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants // Free Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 31, № 2. P. 266–274.
- Oteiza P. I., Clegg M. S., Zago M. P., et al. Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells // Free Radical Biol. Med. 2000. Vol. 28. P. 1091–1099.
- Ho E., Ames B. N. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, Nfκappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. Vol. 99. P. 16770–16775.
- Song Y., Leonard S. W., Traber M. G., et al. Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats // J. Nutr. 2009. Vol. 139. P. 1626–1631.
- Brennan A. M., Suh S. W., Won S. J., et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation // Nat. Neurosci. 2009. Vol. 12. P. 857–863.
- Paoletti A. M., Vergnano A. M., Barbour B., et al. Zinc at glutamatergic synapses // Neuroscience. 2009. Vol. 158. P. 126–136.
- Gee K. R., Zhou Z. L., Ton-That D., et al. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes // Cell Calcium. 2002. Vol. 31, № 5. P. 245–251.
- Bratosin D., Mitrofan L., Palli C., et al. Novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging // Cytometry A. 2005. Vol. 66A. P. 78–84.
- Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups // Arch Biochem Biophys. 1959. Vol. 82, № 1. P. 70–77.



17. Moin V. M. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 724–727.
18. Королук М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. Метод определения каталазной активности // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
19. Abcam [Electronic resource] / Anti-Metallothionein antibody [UC1MT]. URL: <http://www.abcam.com/metallothionein-antibody-uc1mt-ab12228.html> (date of access: 04.10.2015).
20. McCabe M. J., Jiang S. A., Orrenius S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes // Lab. Invest. 1993. Vol. 69. P. 101–110.
21. Harmaza Y., Slobozhanina E. Zinc homeostasis and eryptosis // FEBS J. 2013. Vol. 280, issue 1. P. 218.
22. Гармаза Ю. М., Тамашевский А. В., Гончарова Н. В. и др. Влияние внутриклеточного уровня цинка в эритроцитах человека на перераспределение фосфатидилсерина и их жизнеспособность // Новости медико-биологических наук. 2011. Т. 3, № 1. С. 90–95.
23. Гармаза Ю. М., Тамашевский А. В., Канаиш Ю. С. и др. Внутриклеточный цинк: роль в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека // Биофизика. 2016. Т. 61, вып. 6. С. 1149–1158.
24. Гармаза Ю. М., Тамашевский А. В., Слобожанина Е. И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль // Известия НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2016. № 1. С. 107–116.
25. Min K. S., Tanaka N., Horie T., et al. Metallothionein-enriched hepatocytes are resistant to ferric nitriloacetate toxicity during conditions of glutathione depletion // Toxicol. Lett. 2005. Vol. 158. P. 108–115.
26. Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., et al. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma // Curr. Med. Chem. 2011. Vol. 18. P. 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. P. 120–127.
28. Eide D. J. The oxidative stress of zinc deficiency // Metallomics. 2011. Vol. 3. P. 1124–1129.

## References

1. Maret W., & Li Y. (2009). Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chemical Reviews*, 109(10), 4682–4707. DOI:10.1021/cr800556u.
2. Andreini C., Banci L., Bertini I., & Rosato, A. (2006). Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *J. of Proteome Research*, 5(1), 196–201. DOI:10.1021/pr050361j.
3. Harmaza Y. M., Slobozhanina E. I. [Garmaza Yu. M., Slobozhanina E. I.] (2014) Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects [Essentsialnoŭ i toksichnoŭ tsinka. Biofizicheskie aspektyi]. *Biophysics*, 59(2), 322–337 (in Russ.).
4. Prasad A. S., Halsted, J. A., & Nadimi, M. (1961). Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *The Americ. J. of Med.*, 31(4), 532–546. DOI:10.1016/0002-9343(61)90137-1.
5. Moynahan E. (1974). Acrodermatitis Enteropathica: A Lethal Inherited Human Zinc-Deficiency Disorder. *The Lancet*, 304(7877), 399–400. DOI:10.1016/s0140-6736(74)91772-3.
6. Wang K., Zhou B., Kuo Y., et al. (2002). A Novel Member of a Zinc Transporter Family Is Defective in Acrodermatitis Enteropathica. *The Americ. J. of Human Genet.*, 71(1), 66–73. DOI:10.1086/341125
7. Prasad A. S. (2014). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J. of Trace Elem. in Med. and Biol.*, 28(4), 357–363. DOI:10.1016/j.jtemb.2014.09.002.
8. Zago M., & Oteiza P. I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biol. and Med.*, 31(2), 266–274. DOI:10.1016/s0891-5849(01)00583-4.
9. Oteiza P. (2000). Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biol. and Med.*, 28(7), 1091–1099. DOI:10.1016/s0891-5849(00)00200-8.
10. Ho E., & Ames B. N. (2002). Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proceed. of the Nation. Acad. of Scien.*, 99(26), 16770–16775. DOI:10.1073/pnas.222679399.
11. Song Y., Leonard S. W., Traber M. G., et al. (2009). Zinc Deficiency Affects DNA Damage, Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and DNA Repair in Rats. *J. of Nutrition*, 139(9), 1626–1631. DOI:10.3945/jn.109.106369.
12. Brennan A. M., Suh S. W., Won S. J., et al. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience*, 12(7), 857–863. DOI:10.1038/nn.2334.
13. Paoletti P., Vergnano A., Barbour B., et al. (2009). Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 158(1), 126–136. DOI:10.1016/j.neuroscience.2008.01.061.
14. Gee K., Zhou Z., Ton-That D., et al. (2002). Measuring zinc in living cells. *Cell Calcium*, 31(5), 245–251. DOI:10.1016/s0143-4160(02)00053-2.
15. Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., et al. (2005). Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A*, 66A(1), 78–84. DOI:10.1002/cyto.a.20152.
16. Ellman G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archiv. of Biochem. and Biophys.*, 82(1), 70–77. DOI:10.1016/0003-9861(59)90090-6.
17. Moin V. M. [Moin V. M.] (1986) A simple and specific method for determining of the glutathione peroxidase activity in erythrocytes [Prostoy i spetsificheskiy metod opredeleniya aktivnosti glutationperoksidazyi v eritrotsitah]. *Lab. diagn. [Lab. delo]*, 12, 724–727 (in Russ).
18. Koroluk M. A., Ivanova L. I., Majorova I. G., et al. [Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., Tokareva V.E.] (1988). Method for the determination of catalase activity [Metod opredeleniya katalaznoy aktivnosti]. *Lab. diagn. [Lab. delo]*, 1, 16–19 (in Russ).
19. Abcam [Electronic resource] / Anti-Metallothionein antibody [UC1MT]. URL: <http://www.abcam.com/metallo-thionein-antibody-uc1mt-ab12228.html> (date of access: 04.10.2015).

20. McCabe M. J., Jiang S. A. & Orrenius S. (1993). Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. *Lab. Invest.*, 69(1), 101–110.
21. Harmaza Y. & Slobozhanina E. (2013). Zinc homeostasis and eryptosis. *FEBS J.*, 280(1), 218.
22. Harmaza Y. M., Tamashevski A. V., Goncharova N. V., et al. [Garmaza Yu. M., Tamashevskiy A. V., Goncharova N. V., Slobozhanina E. I.] (2011) Influence of intracellular level of zinc in human erythrocytes on the redistribution of phosphatidylserine and their viability [Vliyanie vnutrikletchnogo urovnya tsinka v eritrotsitah cheloveka na pereraspredelenie fosfatidilserina i ih zhiznesposobnost]. *News of biomed. scien. [Novosti med.-biol. nauk]*, 3(1), 90–95 (in Russ).
23. Harmaza Y. M., Tamashevski A. V., Kanash J. S., et al. [Garmaza Yu. M., Tamashevskiy A. V., Kanash Yu. S., Zubritskaya G. P., Kutko A. G., Slobozhanina E. I.] (2016). Intracellular Zinc: a Role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes [Vnutrikletchnyy tsink: rol v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indutsirovannom oksislitelnom stresse v eritrotsitah cheloveka] *Biophysics [Biofizika]*, 61(6), 1149–1158 (in Russ).
24. Harmaza Y. M., Tamashevski A. V. & Slobozhanina E. I. [Garmaza Yu. M., Tamashevskiy A. V., Slobozhanina E. I.] (2016). Mammalian methalothioneins: structure and biological role [Metallothioneinyi mlekopitayuschih: struktura i biologicheskaya rol]. *Proceed. of the Nation. acad. of scien. of Belarus [Izvestiya NAN Belarusi]*, 1, 107–116 (in Russ.).
25. Min K. S., Tanaka N., Horie T., et al. Metallothionein-enriched hepatocytes are resistant to ferric nitriloacetate toxicity during conditions of glutathione depletion. *Toxicol. Lett.* 2005. Vol. 158. P. 108–115.
26. Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., et al. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr. Med. Chem.* 2011. Vol. 18. P. 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. P. 120–127.
28. Eide D. J. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics.* 2011. Vol. 3. P. 1124–1129.

Статья поступила в редколлегию 25.05.2017  
Received by editorial board 25.05.2017