

ЦИНКОВЫЙ ГОМЕОСТАЗ И ЭРИПТОЗ

Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси», Минск, garmaza@yandex.ru*

Цинк (Zn^{2+}) – жизненно необходимый микроэлемент, который контролирует процессы пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели, может имитировать действие гормонов, ростовых факторов, цитокинов, тем самым, выступая в качестве “сигнальной молекулы”. При этом физиологическая концентрация ионов цинка в сыворотке крови человека составляет порядка 2–15 мкМ, в то время как их свободный уровень в большинстве клеток чрезвычайно низкий (< 1 нМ). Поэтому не удивительно, что во многих клетках существует сложная регуляторная система, обеспечивающая поддержание низкого уровня цитозольного Zn^{2+} . Однако к настоящему времени накоплен эмпирический материал о негативных эффектах его повышенной концентрации в клетках, как при физиологических (возрастные изменения), так и при патологических (артериальная гипертензия, болезнь Альцгеймера и др.) условиях в организме. Но, до сих пор, открытым остается вопрос о количестве цинка, необходимого для нормального функционирования клеток [1].

Целью работы явилось выяснение связи цинкового гомеостаза с индукцией запрограммированной гибели эритроцитов (эриптозом). 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.

В работе использована кровь здоровых доноров в консерванте "глюцир". Об изменении внутриклеточной лабильной концентрации ионов цинка судили по интенсивности флуоресценции FluoZin-3. Процент “эриптотических” клеток оценивали по степени экспозиции фосфатидилсерина во внешнем монослое липидного бислоя с помощью FITC–конъюгированного рекомбинантного аннексин-V. Цитозольную эстеразную активность эритроцитов оценивали с помощью кальцеина-AM. Образование свободнорадикальных соединений оценивали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF-DA$) по интенсивности флуоресценции конечного продукта 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF). Все флуоресцентные измерения были вы-

полнены на спектрофлуориметре “Cary Eclipse” (Varian) и на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickenson).

Для изучения регуляции цинкового гомеостаза в эритроцитах человека были использованы хелаторы этого элемента двух типов: мембранопроницаемый хелатор N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамин (TPEN), который обладает высокой аффинностью к Zn^{2+} ($3,8 \cdot 10^{15} M^{-1}$) и мембранонепроницаемый хелатор – диэтилентридиаминпентауксусная кислота (DTPA). При добавлении внутриклеточного хелатора TPEN к суспензии клеток, предварительно нагруженных флуоресцентным красителем FluoZin-3-AM, было обнаружено резкое скачкообразное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 до базального уровня, что свидетельствует о необратимом истощении эритроцитов по Zn^{2+} . В опытах, когда к эритроцитам был добавлен внеклеточный хелатор DTPA, 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^{2+} из клеточных депо для восполнения его недостатка на мембране. Таким образом, можно предположить, что на поверхности эритроцитов находятся специфические рецепторы, отвечающие за поддержание цинкового гомеостаза.

Ранее было показано, что ионы цинка в токсичных концентрациях активирует секреторную сфингомиелиназу, что, в свою очередь, приводит к усиленному образованию керамидов – важного триггера эриптоза [2]. Однако до сих пор оставалось не ясным, как опосредуется Zn-индуцированная гибель эритроцитов. Нами установлено, что 2-часовое воздействие ионов цинка в физиологических (10 мкМ) и фармакологических (50–100 мкМ) концентрациях на эритроциты *in vitro* сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации лабильных Zn^{2+} в наномолярном диапазоне (30–70 нМ), при этом жизнеспособность клеток и ассиметричное распределение фосфатидилсерина в их мембранах не изменяется. Воздействие ионов цинка в токсичной концентрации (500 мкМ), приводящее к возрастанию их внутриклеточной лабильной концентрации свыше 100 нМ, также не вызывает заметного увеличения аннексин-позитивных эритроцитов (2–3%), но снижает их жизнеспособность (до 40%), что свидетельствует о внутриклеточных изменениях, предшествующих эриптозу. При нагрузке эритроцитов ионами цинка в тех же концентрациях с помощью специфического ионофора Напиритиона происходит ингибирование цитозольной эстеразной активности (на 40–65%) и нарушение ассиметрии фосфатидилсерина в липидном

бислое клеток (наблюдалось 20–45% аннексин-позитивных эритроцитов). Последнее указывает на то, что увеличение цитозольного пула лабильных Zn^{2+} свыше 100 нМ приводит к запуску процессов эриптоза. При этом цитотоксический эффект ионов цинка обусловлен внутриклеточными молекулярными механизмами, приводящими к выходу ионов цинка из клеточных депо.

С целью выявления одного из механизмов описанных выше внутриклеточных изменений в эритроцитах, было изучено образование в них свободнорадикальных соединений. Установлено, что с одной стороны, на начальных стадиях регистрации (1 ч) уровня активных форм кислорода (АФК), ионы цинка проявляют антиоксидантную активность (что согласуется с литературными данными [3]). С другой стороны, при увеличении времени инкубации до 4 ч, наблюдается прооксидантная активность этого микроэлемента. При моделировании окислительного стресса в эритроцитах человека *in vitro* с использованием третбутилгидроперекиси установлено, что ионы цинка дозозависимым образом ускоряют его развитие. Это можно объяснить их способностью ингибировать активность основных ферментов антиоксидантной системы эритроцитов [4]. 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.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании механизмов регуляции цинкового гомеостаза в эритроцитах человека и тонкой концентрационной грани между его “эссенциальными” и токсичными свойствами, нарушение которой может привести к запуску процессов запрограммированной клеточной гибели.

Литература

1. O'Halloran T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis // *Science*. – Vol. 292. – 2001. – P. 2488 – 2492.
2. Kiedaisch V., Akel A., Niemoeller O.M., Wieder T., Lang F. Zinc-induced suicidal erythrocyte death // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – Vol. 87, N 5. – P. 1530 – 1534.
3. Powell S.R. The antioxidant properties of zinc // *J. Nutr.* – 2000. – Vol. 130. – P. 1447S – 1454S.
4. Barceloux D.G. Zinc // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 1999. – Vol. 37, № 2. – P. 279 – 292.