

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ЦИНК: РОЛЬ В H_2O_2 -ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2016 г. Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Ю.С. Канащ, Г.П. Зубрицкая, А.Г. Кутько, Е.И. Слобожанина

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь
E-mail: garmaza@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.15 г.

Показано, что воздействие H_2O_2 в концентрациях 30–1000 мкМ на эритроциты человека *in vitro* приводит к дозозависимому увеличению внутриклеточного пула Zn^{2+} и ингибированию цитозольной эстеразной активности – основного маркера жизнеспособности эритроцитов, причем полученный эффект зависит от концентрации H_2O_2 и времени инкубации клеток с ним. Выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного уровня лабильных ионов цинка и эстеразной активности в клетках, подвергшихся воздействию пероксида водорода, что свидетельствует об участии Zn^{2+} в процессе программируемой гибели эритроцитов. Впервые продемонстрировано, что сочетанное воздействие пероксида водорода и внутриклеточного хелатора ионов цинка N',N' -тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамина снимает цитотоксичный эффект H_2O_2 , а добавление Zn^{2+} в среду инкубации эритроцитов с H_2O_2 приводит к усилению его действия. Установлено, что одним из механизмов, приводящим к высвобождению Zn^{2+} из внутриклеточных связывающих сайтов в эритроцитах человека при H_2O_2 -индуцированном окислительном стрессе, может являться уменьшение количества небелковых тиольных групп за счет снижения уровня восстановленного глутатиона.

Ключевые слова: внутриклеточный цинк, окислительный стресс, эритроциты человека, жизнеспособность, антиоксидантные ферменты, тиольные группы.

Известно, что ионы цинка участвуют в защите биологических структур от окислительного стресса путем поддержания определенного уровня глутатиона и металлотионеинов, взаимодействуя с ионами переходных металлов и т.д. [1,2]. Ранее было показано, что инкубация тимоцитов крыс с пероксидом водорода приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , а удаление внеклеточного Ca^{2+} значительно ослабляет клеточную гибель (как по апоптотическому, так и по некротическому пути), индуцированную H_2O_2 [3]. Однако также обнаружено, что добавление в среду инкубации клеток хелатора ионов цинка приводит к усилению цитотоксичности A23187, ионофора для ионов кальция [4]. Авторы этой работы сделали предположение об участии внутриклеточных ионов цинка в Ca^{2+} -зависимой клеточной гибели. Нами было установлено, что при увеличении цитозольной концентрации Zn^{2+} в эритроцитах на 50 нМ происходит снижение жизнеспособности эритроцитов и перераспреде-

ние фосфатидилсерина в липидном бислое клеточной мембраны, а сдвиг баланса в системе «прооксиданты/антиоксиданты» в пользу первых запускает структурно-функциональные внутриклеточные изменения [5–7]. Соответственно, внутриклеточное содержание ионов цинка в эритроцитах человека тесно связано с их окислительно-восстановительным балансом, а данный ответ клеток контролируется преимущественно внутриклеточным «лабильным» пулом Zn^{2+} , под которым принято понимать сумму свободных и слабосвязанных ионов [8].

Целью данной работы явилось выяснение роли внутриклеточного лабильного пула ионов цинка в развитии H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса в эритроцитах человека и выявление участия Zn^{2+} в формировании в клетках защитных механизмов при окислительном стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров, полученная из Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских био-

Сокращения: TPEN – N',N' -тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамин, NEM – N-этилмалеимид, NAC – N-ацетил-L-цистеин, GSH – восстановленный глутатион.

технологий 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 мМ). Инкубацию эритроцитов (1%-й или 0,1%-й гематокрит) с H₂O₂, внутриклеточным хелатором ионов цинка – N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамином (ТРЕN) и хлоридом цинка проводили при 37°C в течение 30 или 60 мин в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,4), содержащем 155 мМ NaCl, а с N-этилмалеимидом (NEM) в концентрациях 10 и 30 мкМ и с N-ацетил-L-цистеином (NAC) в концентрациях 100 и 300 мкМ – в течение 90 и 180 мин, соответственно, при тех же условиях.

Для оценки внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM [9,10]. Для этого эритроциты, ресуспензированные в 10 мМ трис-HCl-буфере + 155 мМ NaCl (pH 7,4) до 0,1%-го гематокрита, нагружали красителем в течение 30 мин при 37°C. Зонд, не связавшийся с эритроцитами, отмывали центрифугированием суспензии клеток при 2000 *g* (10 мин), ресуспензировали в исходном буфере, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте и дважды отмывали в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,4), содержащем 155 мМ NaCl (2000 *g*, 10 мин). После этого проводили измерение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в FITC-H-канале на проточном цитофлуориметре.

Внутриклеточную эстеразную активность оценивали с использованием флуоресцирующего красителя кальцеина-AM согласно методу [11]. Для этого клетки с измененным и окислительно-восстановительным балансом и концентрацией ионов цинка инкубировали в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,4), содержащем 155 мМ NaCl с кальцеином-AM в конечной концентрации 2 мкМ в течение 40 мин при 37°C, затем отмывали от свободного кальцеина-AM путем центрифугирования (2000 *g*, 10 мин), после чего проводили цитофлуориметрический анализ в FITC-H-канале на проточном цитофлуориметре. По интенсивности флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) кальцеина судили об эстеразной активности эритроцитов.

Содержание восстановленного глутатиона, активность антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы и каталазы определяли спектрофотометрически по методам, описанным в работах [12–14] соответственно.

Флуоресцентные измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickenson, США), 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 пяти-восьми независимых экспериментов в виде $x_{\text{ср}} \pm s_x$, где $x_{\text{ср}}$ – среднее значение, s_x – стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование окислительного стресса в эритроцитах путем индукции H₂O₂. Для моделирования состояния окислительного стресса в эритроцитах человека был использован пероксид водорода. Показано, что при воздействии H₂O₂ окислительные процессы в клетке начинаются сразу же после его добавления и быстро выходят на плато в отличие от эффектов, индуцированных *трет*-бутилгидропероксидом, которые развиваются более медленно и усиливаются со временем [15]. Используемые концентрации H₂O₂ были выбраны исходя из литературных [16–18] и собственных экспериментальных данных по оценке антиоксидантного статуса эритроцитов (уровень восстановленного глутатиона (GSH), активность глутатионпероксидазы и каталазы). Известно, что наиболее важным элементом системы глутатиона является глутатионпероксидаза, которой принадлежит основная роль в утилизации липидных гидроперекисей и пероксида водорода [13]. Результаты проведенных исследований показали, что в эритроцитах, подвергшихся воздействию H₂O₂ в концентрациях 30–1000 мкМ, происходит достоверное снижение активности глутатионпероксидазы по сравнению с контрольными клетками (табл. 1). Если при действии на эритроциты H₂O₂ в концентрациях 30 и 100 мкМ наблюдается в среднем 25%-е снижение активности этого фермента, то при действии 500 и 1000 мкМ H₂O₂ – 40%-е ингибирование (табл. 1). Как видно из табл. 1, активность каталазы, функция которой также заключается в утилизации H₂O₂, достоверно была снижена только при действии H₂O₂ в концентрации 500 мкМ, в то время как при более низких концентрациях H₂O₂ (30 и 100 мкМ) активность фермента не изменялась. Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что в эритроцитах при высокой скорости образования пероксида водорода преобладает каталазная активность, а при низкой скорости образования H₂O₂ – пе-

Таблица 1. Параметры, характеризующие состояние антиоксидантной системы (активности глутатионпероксидазы, каталазы и уровень GSH) эритроцитов, до (контроль) и после воздействия агентов, изменяющих окислительно-восстановительный баланс и цинковый гомеостаз клеток

	$A_{ГП}$, мкМ/мин	$A_{КАТ}$, мккат/мин	[GSH], мМ
Интактные эритроциты (контроль)	160,20 ± 7,90	4,19 ± 0,52	0,95 ± 0,02
Агенты, изменяющие окислительно-восстановительный баланс в эритроцитах			
H ₂ O ₂ , 30 мкМ	121,80 ± 2,80	4,33 ± 0,31	0,87 ± 0,06
H ₂ O ₂ , 100 мкМ	120,11 ± 3,37*	4,23 ± 0,45	0,54 ± 0,04
H ₂ O ₂ , 500 мкМ	100,98 ± 23,80*	3,55 ± 0,14*	0,35 ± 0,06*
H ₂ O ₂ , 1000 мкМ	118,10 ± 12,10	3,74 ± 0,24	0,35 ± 0,05*
Агенты, изменяющие цинковый гомеостаз эритроцитов			
TPEN, 25 мкМ	66,9 ± 10,8*	2,90 ± 0,50*	0,95 ± 0,04
ZnCl ₂ , 50 мкМ	51,40 ± 5,70*	2,4 ± 0,60*	1,03 ± 0,06
Совместное воздействие двух групп агентов			
500 мкМ H ₂ O ₂ + 25 мкМ TPEN	114,75 ± 13,70	3,58 ± 0,50	0,34 ± 0,02
500 мкМ H ₂ O ₂ + 50 мкМ ZnCl ₂	103,20 ± 13,90	2,58 ± 0,70 [#]	0,35 ± 0,02

Примечание. * – Различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с эритроцитами, обработанными 500 мкМ H₂O₂, достоверны ($p < 0,05$).

роксидазная [15]. Также установлено, что концентрация восстановленного глутатиона, главного низкомолекулярного антиоксиданта эритроцитов [19], снижается пропорционально содержанию H₂O₂ в среде инкубации эритроцитов (табл. 1). Если при действии H₂O₂ в концентрациях 30 и 100 мкМ происходит уменьшение концентрации GSH в среднем на 10 и 40% соответственно, то при действии H₂O₂ в концентрациях 500 и 1000 мкМ – в среднем на 60–70% (табл. 1). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что H₂O₂ в концентрациях от 30 до 1000 мкМ при 30-минутной экспозиции является адекватным агентом для моделирования окислительного стресса в эритроцитах человека, а концентрация H₂O₂ в 500 мкМ оказалась наиболее актуальной с точки зрения решения поставленных задач. При этом учитывались и литературные данные о том, что низкие концентрации H₂O₂ (0,45–1 мМ) без предварительного ингибирования каталазы не вызывают заметного гемолиза эритроцитов [17,18].

Оценка содержания внутриклеточного цинка в условиях H₂O₂-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах. Для изучения вариаций содержания внутриклеточного цинка был использован флуоресцентный зонд, который связывает «лабильный» пул Zn²⁺ и при этом изменяет свои эмиссионные свойства. Так как известно, что концентрация свободного пула Zn²⁺ в эритроцитах человека составляет порядка 1 пМ [20], а его уровень колеблется в

диапазоне 1 нМ [8], то для достижения поставленной цели был выбран флуоресцентный индикатор FluoZin-3, который позволяет контролировать даже незначительные изменения количества Zn²⁺ в клеточном цитозоле [9,10].

Показано, что инкубация эритроцитов человека с H₂O₂ в исследуемых концентрациях приводит к статистически достоверному дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3, свидетельствующему об увеличении внутриклеточного пула Zn²⁺. Как видно из рис. 1а, при воздействии H₂O₂ в концентрации 30 мкМ интенсивность флуоресценции FluoZin-3 увеличивается в среднем до 10%, при инкубации со 100 мкМ – до 15%, при инкубации с 500 мкМ – на 15–25%, а при воздействии 1000 мкМ H₂O₂ – на 30–40%. Полученный эффект зависит также от времени воздействия H₂O₂ – если после 30-минутной инкубации эритроцитов с H₂O₂ внутриклеточное содержание Zn²⁺ увеличивается в среднем до 35%, то после 60 мин – до 70% по отношению к интактным клеткам (рис. 1а).

Параллельно с изучением «размера» внутриклеточного пула Zn²⁺ в H₂O₂-обработанных эритроцитах проведена оценка их цитозольной эстеразной активности – основного маркера жизнеспособности клеток. На рис. 2 представлены репрезентативные точечные диаграммы флуоресценции кальцеина в эритроцитах после воздействия H₂O₂. Они наглядно демонстрируют порядок величин интенсивности флуоресценции кальцеина (параметр MFI – mean value

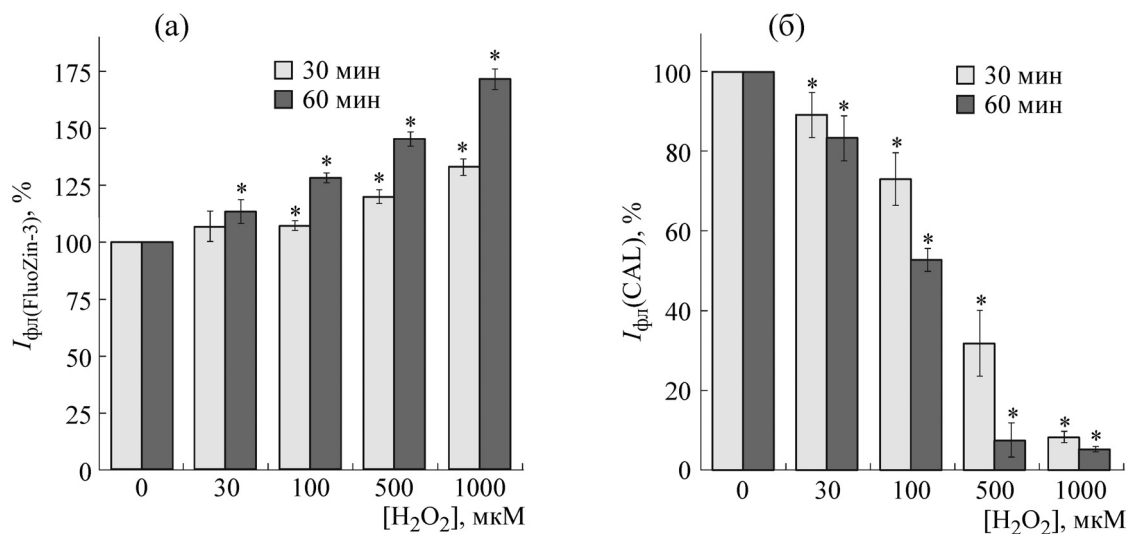


Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 (а) и кальцеина (б) от времени экспозиции и концентрации пероксида водорода в среде инкубации эритроцитов человека. За 100% принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 или кальцеина в интактных эритроцитах; * – различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$).

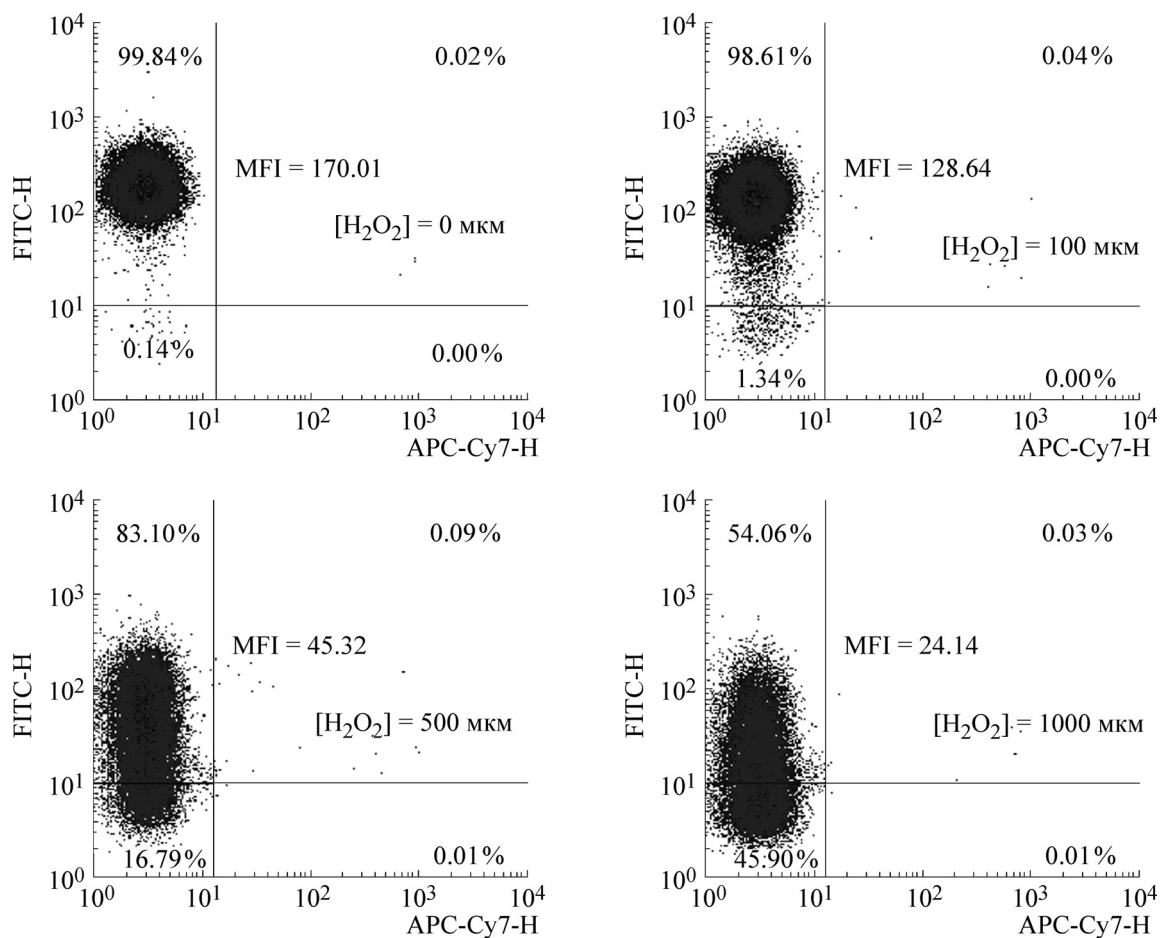


Рис. 2. Репрезентативные точечные диаграммы флуоресценции кальцеина в эритроцитах, подвергшихся воздействию пероксида водорода в различных концентрациях.

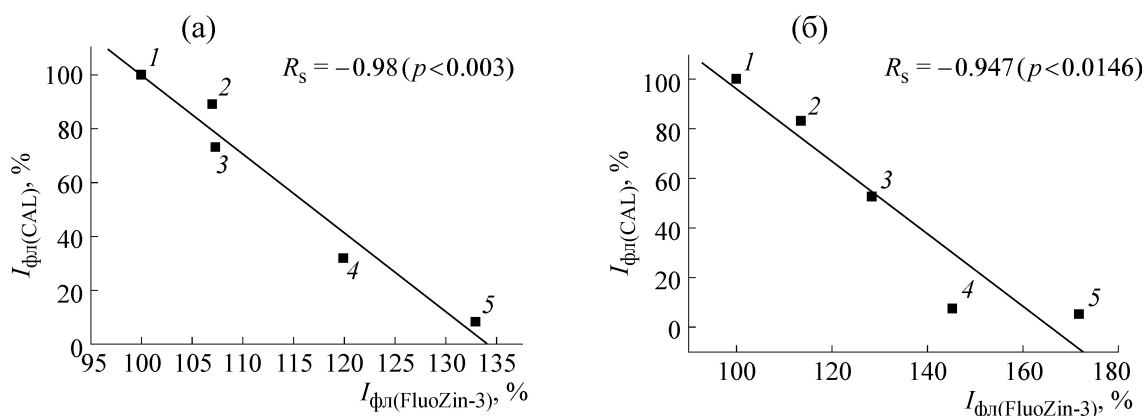


Рис. 3. Корреляционные взаимосвязи между интенсивностью флуоресценции FluoZin-3 и кальцеина в эритроцитах, подвергшихся воздействию пероксида водорода в течение 30 мин (а) и 60 мин (б). 1 – Интактные эритроциты; 2 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 30 мкМ H_2O_2 ; 3 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 100 мкМ H_2O_2 ; 4 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 500 мкМ H_2O_2 ; 5 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 1000 мкМ H_2O_2 .

of fluorescence intensity), загруженного в эритроциты после 30 мин воздействия H_2O_2 в концентрациях 100, 500 и 1000 мкМ. Если в контрольных клетках значение MFI составило 170,01 отн. ед., то в клетках после обработки H_2O_2 в концентрации 100 мкМ – 128,64 отн. ед.; 500 мкМ – 45,32 отн. ед., а 1000 мкМ – 24,14 отн. ед. Таким образом, воздействие H_2O_2 в изученных концентрациях (30–1000 мкМ) приводит к снижению интенсивности флуоресценции кальцеина на 5–90% при 30-минутной инкубации и на 15–95% при 60-минутном воздействии, что свидетельствует об ингибировании цитозольной эстеразной активности эритроцитов человека (рис. 16). Более того, проведенный корреляционный анализ выявил обратную статистически значимую зависимость между изменением внутриклеточного уровня лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активности эритроцитов, подвергшихся воздействию H_2O_2 ($r_{s1} = -0,98$, $p = 0,003$; $r_{s2} = -0,947$, $p = 0,015$ соответственно после 30- и 60-минутной инкубации) (рис. 3).

На основании полученных экспериментальных результатов и проведенного корреляционного анализа можно заключить, что развитие окислительного стресса в эритроцитах человека под воздействием пероксида водорода сопровождается увеличением цитозольного пула лабильных ионов цинка и активацией процессов эриптоза (программируемой клеточной гибели), так как известно, что ингибирование цитозольной эстеразной активности может свидетельствовать о внутриклеточных изменениях, предшествующих начальным стадиям эриптоза [5,21]. Однако остается открытым вопрос о возможных механизмах, приводящих к H_2O_2 -ин-

дуцированному изменению внутриклеточного пула Zn^{2+} и жизнеспособности эритроцитов.

Эффекты TPEN и ZnCl_2 на H_2O_2 -индуцированное увеличение цитозольного содержания Zn^{2+} и цитотоксичность эритроцитов. Известно, что в большинстве типов клеток значительное количество внутриклеточного цинка связывается с белками, что определяет их важные структурные и каталитические функции. Такие белки называют цинковыми металлопротеинами («zinc proteome») [8]. Как было сказано выше, содержание лабильных ионов цинка в эритроцитах очень низкое (< 1 нМ), при этом в целом клетки содержат порядка 70 мкМ Zn^{2+} [7]. Из этого количества около 90–95% ионов цинка связано в эритроцитах с двумя ферментами: супероксиддисмутазой и карбоангидразой посредством высокоаффинных связей. В дополнение к этим высокоаффинным сайтам в клетке также существуют низкоаффинные Zn-связывающие сайты. Они включают слабосвязывающие сайты на белках, липидах, а также низкомолекулярные компоненты, такие как органические анионы (например, цитрат), аминокислоты (гистидин) и глутатион [1,8]. Более того, показано, что в клетках существуют так называемые депо для хранения этого микроэлемента, так как ионы цинка участвуют в процессах регуляции и клеточной сигнализации [2]. Например, это – Zn-связывающие белки металлотионеины, основная функция которых – аккумуляция и хранение ионов цинка. В литературе также описаны такие внутриклеточные депо цинка, как цинкосомы, представляющие собой везикулы, «нагруженные» этим ионом [8]. Таким образом, на основании имеющихся литературных данных мы предположили, что

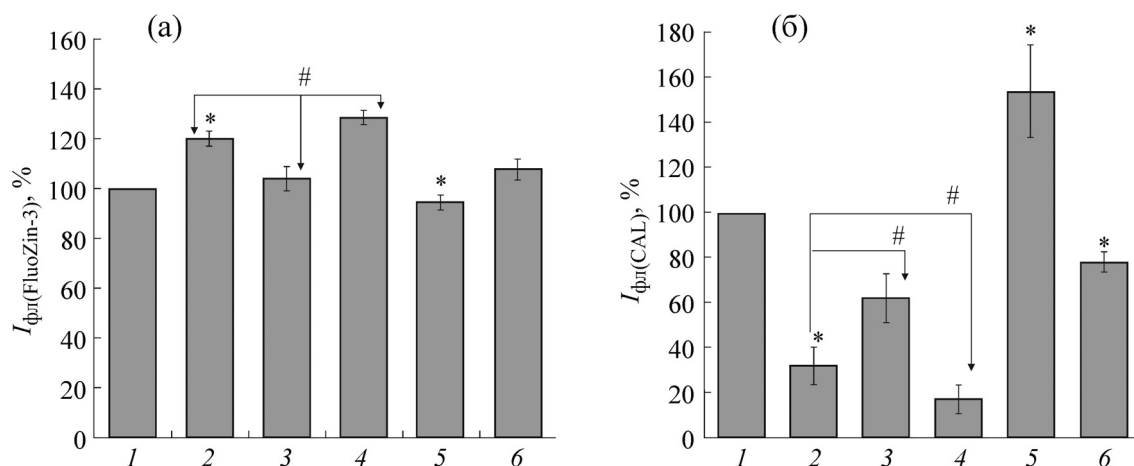


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции FluoZin-3 (а) и кальцеина (б) в эритроцитах, подвергшихся воздействию агентов, изменяющих цинковый гомеостаз клеток. 1 – Интактные эритроциты; 2 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 500 мкМ H₂O₂; 3 – эритроциты, подвергшиеся сочетанному воздействию 500 мкМ H₂O₂ + 25 мкМ TPEN; 4 – эритроциты, подвергшиеся сочетанному воздействию 500 мкМ H₂O₂ + 50 мкМ ZnCl₂; 5 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 25 мкМ TPEN; 6 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 50 мкМ ZnCl₂. За 100% принято среднее значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 и кальцеина в интактных эритроцитах; * – различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с эритроцитами, обработанными 500 мкМ H₂O₂, достоверны ($p < 0,05$).

одной из причин, приводящих к H₂O₂-индуцированному увеличению внутриклеточного уровня Zn²⁺, может выступать высвобождение данного микроэлемента из внутриклеточных депо или связывающих сайтов.

Для подтверждения нашего предположения наряду с H₂O₂ мы использовали агенты, изменяющие содержание ионов цинка в клетке: специфический мембранопроницаемый хелатор TPEN, который обладает высоким сродством к Zn²⁺ (применяется для истощения внутриклеточного лабильного пула цинка), а также хлорид цинка – для внесения дополнительных ионов цинка в клетку извне.

Оценка внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка в эритроцитах человека после сочетанного воздействия H₂O₂ и TPEN выявила статистически достоверное дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 вплоть до уровня, характерного для интактных клеток по сравнению со значением данного параметра в H₂O₂-обработанных эритроцитах (рис. 4а). При этом установлено, что сочетанное воздействие H₂O₂ и ZnCl₂ приводит к увеличению интенсивности флуоресценции FluoZin-3 с $119,95 \pm 3,04\%$ (в H₂O₂-обработанных клетках) до $128,41 \pm 2,99\%$ (в клетках, обработанных H₂O₂ + ZnCl₂) (рис. 4а). Для сравнения продемонстрировано, что 30-минутная инкубация эритроцитов с хелатором цинка TPEN в концентрации 25 мкМ сопровождается снижением флуоресценции FluoZin-3 в среднем на 6% ($94,4 \pm 2,92\%$), а с хлоридом цинка в

концентрации 50 мкМ ее увеличением на 5–10% ($107,56 \pm 4,25\%$) (рис. 4а).

Также продемонстрировано, что, с одной стороны, сочетанное воздействие H₂O₂ и TPEN частично снимает цитотоксичный эффект H₂O₂ – жизнеспособность эритроцитов снижается в среднем на 40% (по сравнению с 70% в H₂O₂-обработанных клетках), а добавление Zn²⁺ в среду инкубации эритроцитов с H₂O₂ приводит к усилению его эффекта в среднем на 10–30% (рис. 4б). С другой стороны, показано, что 30-минутная инкубация эритроцитов с хелатором цинка TPEN приводит к увеличению флуоресценции кальцеина на 30–70%, а с хлоридом цинка – снижает ее на 20–25% по сравнению с интактными клетками (рис. 4б). Эти данные указывают на регулируемую роль внутриклеточных ионов цинка в процессах, определяющих жизнеспособность эритроцитов.

Сравнительная оценка антиоксидантного статуса эритроцитов после совместного воздействия агентов, изменяющих концентрацию ионов цинка в клетке (TPEN и ZnCl₂), показала, что при дополнительном внесении этих веществ в среду инкубации эритроцитов с H₂O₂ активность глутатионпероксидазы не изменяется. Однако мы наблюдали ингибирование активности глутатионпероксидазы в среднем на 60 и 70% по сравнению с интактными клетками при действии соответственно TPEN и ZnCl₂. Данный факт указывает на то, что и TPEN, и ZnCl₂ в используемых концентрациях сами по себе проявляют прооксидантные свойства. Как было

продемонстрировано выше, 30-минутная инкубация эритроцитов с H_2O_2 в концентрации 500 мкМ приводила в среднем к 40%-му ингибированию активности глутатионпероксидазы (табл. 1). Также не было выявлено изменений в содержании GSH при воздействии TPEN и $ZnCl_2$ на эритроциты совместно с H_2O_2 , несмотря на имеющуюся тенденцию к увеличению уровня GSH после инкубации клеток с $ZnCl_2$ в концентрации 50 мкМ (табл. 1). Однако обнаружено ингибирование активности каталазы при сочетанном воздействии H_2O_2 и $ZnCl_2$ на 30% по сравнению с воздействием H_2O_2 в концентрации 500 мкМ (табл. 1). В то же время дополнительное внесение в систему «эритроциты– H_2O_2 » внутриклеточного хелатора ионов цинка TPEN не оказывало видимого влияния на активность каталазы несмотря на то, что сам TPEN в концентрации 25 мкМ является более сильным прооксидантом, чем H_2O_2 в концентрации 500 мкМ (табл. 1).

Участие внутриклеточных тиольных групп в H_2O_2 -индуцированном увеличении цитозольного содержания Zn^{2+} . Известно, что цинк действует подобно кислоте Льюиса, принимая электронные пары от SH-групп, т.е. выступая в качестве акцептора электронов [22]. Это снижает pK_a тиольных групп и поддерживает их в нуклеофильном и высокореактивном депротонированном состоянии при нейтральных значениях pH. В то же время связывание ионов цинка молекулами цистеина «предохраняет» их от неспецифического окисления. При действии сильных окислителей цистеин быстро окисляется с высвобождением Zn^{2+} , что приводит к конформационным изменениям в белках и, как следствие, к нарушению их функционирования [1].

Как уже упоминалось, глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин) является низкомолекулярным трипептидом и распространенным клеточным тиолом, который способен предотвращать окисление SH-групп, восстанавливать дисульфидные связи, инактивировать свободные радикалы и участвовать в процессах выведения ксенобиотиков из клеток [23,24]. Одним из предшественников глутатиона, также обладающим антиоксидантной активностью, является N-ацетилцистеин. С одной стороны, он может достаточно быстро накапливаться в клетках и подвергаться диацетилированию, что приводит к значительному увеличению внутриклеточной концентрации GSH [24]. С другой стороны, для снижения/истощения внутриклеточного содержания небелковых тиольных групп, главным образом глутатиона, широко используют N-этилмалеимид – химическое соединение для се-

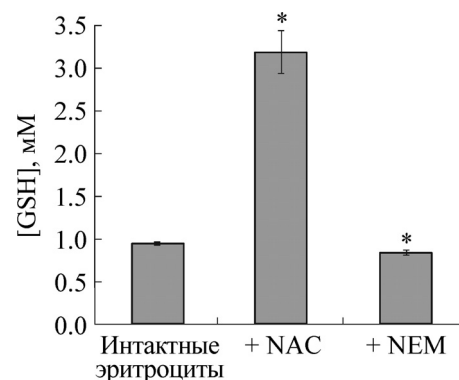


Рис. 5. Концентрация восстановленного глутатиона в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию агентов, изменяющих содержание внутриклеточных тиольных групп. * – Различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$).

лективного связывания тиолов с целью оценки участия SH-групп в том или ином процессе, так как NEM способен формировать ковалентные связи с SH-группами [25]. Учитывая это, на следующем этапе работы была проведена оценка изменения концентрации внутриклеточных ионов цинка в эритроцитах, в которых предварительно с помощью NAC и NEM изменяли содержание тиольных групп.

Для этого была проведена оценка концентрации восстановленного глутатиона. Как видно из рис. 5, предварительная инкубация эритроцитов с NAC в концентрации 300 мкМ приводила к увеличению содержания GSH в среднем в три раза. В то же время после воздействия NEM в концентрации 30 мкМ наблюдается достоверное его снижение в среднем на 15–20%. Полученные нами результаты исследований согласуются с литературными данными относительно эффектов, оказываемых NAC и NEM на концентрацию внутриклеточных тиолов [23–25].

Исходя из литературных данных о существовании взаимосвязи между содержанием Zn^{2+} и SH-групп [22], была проведена оценка внутриклеточного уровня ионов цинка в эритроцитах в условиях снижения/увеличения содержания тиольных групп (после воздействия NEM/NAC соответственно). Как видно из рис. 6, инкубация клеток с NAC в концентрациях 100 и 300 мкМ не влияет на интенсивность флуоресценции FluoZin-3. Более того, из табл. 2 видно, что прединкубация в течение 3 ч эритроцитов с NAC в концентрации 300 мкМ не оказывает влияния на внутриклеточную концентрацию ионов цинка в условиях сдвига окислительно-восстановительного баланса (после воздействия H_2O_2) и содержания

Таблица 2. Средние значения интенсивности флуоресценции FluoZin-3, характеризующие изменение внутриклеточного уровня лабильного Zn^{2+} в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию агентов, модифицирующих содержание тиольных групп (NAC и NEM)

	$I_{фл(FluoZin-3)}$, %		
	В отсутствие NAC и NEM	+ NAC (300 мкМ)	+ NEM (30 мкМ)
Интактные эритроциты	100	100	100
NAC / NEM	–	102,42 ± 2,05	153,44 ± 5,55
H ₂ O ₂ , 500 мкМ	119,95 ± 3,04*	120,97 ± 1,85%	161,02 ± 5,66
TPEN, 25 мкМ	94,4 ± 2,92*	101,61 ± 1,06	138,17 ± 2,11%
ZnCl ₂ , 50 мкМ	107,56 ± 4,25	110,48 ± 3,65%	147,33 ± 1,08
500 мкМ H ₂ O ₂ + 25 мкМ TPEN	103,81 ± 4,81#	101,51 ± 0,89#	142,75 ± 0,45#
500 мкМ H ₂ O ₂ + 50 мкМ ZnCl ₂	128,41 ± 2,99#	127,42 ± 2,54	168,01 ± 1,36

Примечание – Значения интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах приняты за 100%. * – Различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$); % – различия по сравнению с эритроцитами, прединкубированными с NAC/NEM, достоверны ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с эритроцитами, обработанными H₂O₂ в концентрации 500 мкМ, достоверны ($p < 0,05$).

ионов цинка в эритроцитах (после воздействия TPEN и ZnCl₂) несмотря на то, что в данных условиях эритроциты в значительной степени защищены от окислительного стресса, индуцированного H₂O₂. Это подтверждается экспериментами по сравнительной оценке концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитах при H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе до и после прединкубации клеток с NAC (табл. 3).

В то же время прединкубация клеток с NEM в концентрациях 10 и 30 мкМ приводит к дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3, что свидетельствует о NEM-индуцированном увеличении концентрации внутриклеточного цинка в среднем соответственно на 35–40 и 50–60% (рис. 6). Для

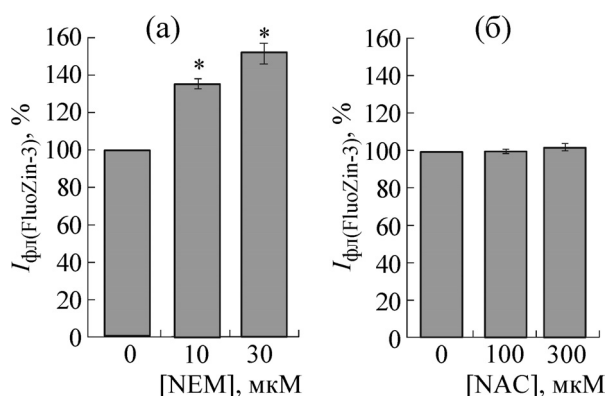


Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от концентрации N-этилмалеимида (а) и N-ацетилцистеина (б). За 100% принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах; * – различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$).

установления источника Zn^{2+} проведено сравнение значений интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в NEM-модифицированных эритроцитах и в интактных клетках после воздействия H₂O₂, TPEN и ZnCl₂. Как видно из табл. 2, инкубация эритроцитов с H₂O₂ в концентрации 500 мкМ сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в среднем на 15–25 (без прединкубации с NEM) и на 55–65% (после прединкубации с NEM) относительно интактных клеток. В условиях, когда в среду инкубации эритроцитов с H₂O₂ был добавлен внутриклеточный хелатор Zn^{2+} – TPEN, изменение значений интенсивности флуоресценции составило в среднем 5% (без прединкубации с NEM) и 40% (после прединкубации с NEM), а добавление в среду инкубации эритроцитов ZnCl₂ (в качестве внеклеточного источника Zn^{2+}) сопровождается также усилением эффекта соответственно в среднем на 25–30 и на 65–70% относительно интактных клеток (табл. 2). В свою очередь, внесение в среду инкубации эритроцитов, предварительно истощенных по SH-группам, внутриклеточного цинкового хелатора TPEN приводит к снижению NEM-индуцированного увеличения относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от 153,44 ± 5,55% (после инкубации с NEM) до 138,17 ± 2,11% (при сочетанном действии NEM + TPEN).

Полученные данные указывают на то, что NEM-индуцированный рост интенсивности флуоресценции FluoZin-3 и соответственно H₂O₂-индуцированное увеличение внутриклеточного содержания ионов цинка сильно зависят от Zn^{2+} , высвобожденного из его внутриклеточных связывающих сайтов. Изменения ин-

Таблица 3. Средние значения уровня GSH в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию агентов, изменяющих содержание тиольных групп (NAC и NEM)

	[GSH], мМ		
	В отсутствие NAC и NEM	+ NAC (300 мкМ)	+ NEM (30 мкМ)
Интактные эритроциты	0,95 ± 0,02	0,95 ± 0,02	0,95 ± 0,02
NAC / NEM	–	3,19 ± 0,25*	0,83 ± 0,02*
H ₂ O ₂ , 500 мкМ	0,35 ± 0,06*	1,43 ± 0,16%	0,72 ± 0,03%
TPEN, 25 мкМ	0,95 ± 0,04	1,17 ± 0,06%	1,11 ± 0,1%
ZnCl ₂ , 50 мкМ	1,03 ± 0,06	2,05 ± 0,05%	1,97 ± 0,02%
500 мкМ H ₂ O ₂ + 25 мкМ TPEN	0,34 ± 0,02	2,84 ± 0,08#	0,71 ± 0,09
500 мкМ H ₂ O ₂ + 50 мкМ ZnCl ₂	0,35 ± 0,02	1,44 ± 0,21	0,77 ± 0,05

Примечание. * – Различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$); % – различия по сравнению с эритроцитами, прединкубированными с NAC/NEM, достоверны ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с эритроцитами, обработанными H₂O₂ в концентрации 500 мкМ, достоверны ($p < 0,05$).

тенсивности флуоресценции FluoZin-3 и концентрации GSH при воздействии NEM предполагают, что снижение содержания внутриклеточных тиолов взаимосвязано с увеличением содержания внутриклеточных лабильных ионов цинка. Тем самым можно предположить, что Zn²⁺, высвобожденный из внутриклеточных депо, во время H₂O₂-индуцированного окислительного стресса запускает процесс восстановления небелковых SH-групп, которое снижается при изменении редокс-состояния клетки.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что при H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека происходит статистически достоверное увеличение содержания лабильного Zn²⁺ и ингибирование цитозольной эстеразной активности – основного маркера жизнеспособности эритроцитов, причем полученный эффект зависит от концентрации H₂O₂ и от времени инкубации его с эритроцитами. Выявлена обратная зависимость между цитозольной концентрацией ионов цинка и эстеразной активностью в эритроцитах, подвергшихся воздействию пероксида водорода, что указывает на роль лабильного Zn²⁺ в активации процессов эритроцитоза.

2. Продемонстрировано, что совместное воздействие пероксида водорода и внутриклеточного хелатора ионов цинка TPEN снимает цитотоксичный эффект H₂O₂, а добавление Zn²⁺ в среду инкубации эритроцитов с H₂O₂ приводит к усилению его действия. Это позволяет заключить, что одной из причин, приводящих к H₂O₂-индуцированному увеличению цитозольного содержания Zn²⁺, может выступать

высвобождение данных ионов из их внутриклеточных депо или связывающих сайтов.

3. Установлено изменение цитозольного содержания ионов цинка и концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитах при воздействии N-этилмалеимида, связывающего небелковые SH-группы, что свидетельствует о существовании корреляции между содержанием в эритроцитах клеточных тиолов и лабильных ионов цинка. Тем самым можно предположить, что Zn²⁺, высвобожденный из внутриклеточных депо, во время H₂O₂-окислительного стресса запускает процесс восстановления уровня содержания небелковых SH-групп, который снижается при изменении редокс-состояния клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. М. Гармаза и Е. И. Слобожанина, Биофизика **59** (2), 322 (2014).
2. J. M. Berg, Science **271** (5252), 1081 (1996).
3. E. Okazaki, L. Chikahisa, K. Kanemaru, and Y. Oyama, Jpn. J. Pharmacol. **71** (4), 273 (1996).
4. Y. Sakanashi, T. M. Oyama, Y. Matsuo, et al., Toxicol. In Vitro **23** (2), 338 (2009).
5. Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Н. В. Гончарова и Е. И. Слобожанина, Новости медико-биол. наук **3** (1), 90 (2011).
6. Y. Harmaza and E. Slobozhanina, FEBS J. **280** (1), 218 (2013).
7. Ю. М. Гармаза, Дис. ... канд. биол. наук (Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточной инженерии, Минск, 2011).
8. D. J. Eide, Biochim. Biophys. Acta **1763**, 711 (2006).
9. K. R. Gee, Z. L. Zhou, D. Ton-That, et al., Cell Calcium **31** (5), 245 (2002).
10. A. R. Kay, BMC Physiol. **4** (4), 1 (2004).

11. D. Bratosin, L. Mitrofan, C. Palli, and J. Estaquier, *Cytometry A* **66A**, 78 (2005).
12. G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82** (1), 70 (1959).
13. В. М. Моин, *Лаб. дело* **12**, 724 (1986).
14. М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова и В. Е. Токорева, *Лаб. дело* **1**, 16 (1988).
15. О. Г. Шевченко, Л. Н. Шишкина, *Успехи соврем. биологии* **134** (2), 133 (2014).
16. Е. И. Слобожанина, Л. М. Лукьяненко и Н. М. Козлова, *Биофизика* **45** (2), 288 (2000).
17. A. Yesilkaya, A. Yegin, G. Yucel, et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.* **26**, 60 (1996).
18. М. Г. Малакян, С. А. Баджинян, Л. А. Вардеванян и др., *Хим. фарм. журн.* **43** (1), 8 (2009).
19. T. Akerboom, H. Sies, and E. J. Vina, Boston: GRG Press, 144 (1990).
20. T. J. Simons, *J. Membr. Biol.* **123**, 63 (1991).
21. Е. И. Белевич, Д. Г. Костин и Е. И. Слобожанина, *Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук.* **2**, 34 (2015).
22. M. Ilbert, P. C. Graf, and U. Jakob, *Antioxid. Redox. Signal* **8** (5–6), 835 (2006).
23. J. E. Raftos, S. Whillier, B. E. Chapman, and P. W. Kuchel, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39** (9), 1698 (2007).
24. D. Yildiz and T. Bagdadioglu, *Toxicol. Mech. Methods* **14**, 241 (2004).
25. N. G. Palmén and C. T. Evelo, *Toxicol. In Vitro* **10**, 273 (1996).

Intracellular Zinc: a Role in H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes

**Y.M. Harmaza, A.V. Tamashevski, J.S. Kanash, G.P. Zubritskaya,
A.G. Kutko, and E.I. Slobozhanina**

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
Akademicheskaya ul. 27, Minsk, 220072 Belarus*

It is shown that *in vitro* influence of 30–1000 μM H₂O₂ on human erythrocytes results in the dose-dependent rise in the intracellular Zn²⁺ pool and inhibition of cytosolic esterase activity – the main marker of cell viability, moreover the received effect depends on H₂O₂ concentration and the time of incubation of cells with H₂O₂. An inverse relationship between changes in the intracellular level of the labile zinc ions and esterase activity in the cells exposed to H₂O₂ is revealed proving the role of Zn²⁺ in the process of programmed erythrocyte death. It was firstly demonstrated that the combination of hydrogen peroxide and intracellular zinc ion chelator N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine abolished the cytotoxic effect of H₂O₂, but Zn²⁺ addition to the incubation medium of erythrocytes with H₂O₂ resulted in intensification of its effect. It is established that one of the mechanisms leading to the release of Zn²⁺ from intracellular binding sites in human erythrocytes under H₂O₂-induced oxidative stress is a decrease in the content of non-protein thiol groups because of diminished blood levels of reduced glutathione.

Key words: intracellular zinc, oxidative stress, human erythrocytes, viability, antioxidant enzymes, thiol groups