(диссекцией) интракраниального отдела внутренней сонной артерии и ее ветвей (клинико-морфологическое наблюдение). Анналы клин. и экспер. неврол. 2009; 3: 1: 18-24

6.Калашникова Л.А. Синдром Снеддона: связь с антителами к кардиолипину. Клин. мед. 2016; 10: 32-37

УДК 577.336

Гармаза Ю.М., Захарова К.А.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ЛАБИЛЬНОГО ПУЛА ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА FluoZin-3

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”
Минск, Беларусь

Harmaza Y.M., Zakharova K.A.

ANALYSIS OF THE LABILE ZINC POOL CHANGE IN HUMAN ERYTHROCYTES USING FLUORESCENT PROBE FluoZin-3

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences
Minsk, Belarus

E-mail: garmaza@yandex.ru

Аннотация. Показано, что уровень внутриклеточного лабильного цинка – это динамическая система, которая изменяется в ответ на внешние стимулы. Использование флуоресцентного красителя FluoZin-3 AM является чувствительным методом для оценки флуктуаций цитозольного цинка в эритроцитах человека.

Annotation. It was shown that the intracellular labile zinc level is a dynamic system that can change in response to external stimuli. Application of the fluorescent dye FluoZin-3 AM is a sensitive method for estimation cytosolic zinc fluctuation in human erythrocytes.

Ключевые слова: эритроциты, лабильный пул цинка, флуоресцентный метод.

Key words: erythrocytes, labile zinc pool, fluorescent method.

Введение

Ионы переходных металлов, такие как железо, медь и цинк, представляют собой непростую дилемму для всех живых организмов. Их уникальные химические свойства позволяют являться кофакторами многочисленных ферментов и белков, что отражается на их относительно высокой суммарной клеточной концентрацией – от 1 до 100 мМ [5]. В то же время известно, что в свободной форме данные ионы очень токсичны. Для железа и меди эта

токсичность в основном связана с их окислительно-восстановительной активностью, что делает их мощными катализаторами для образования свободных радикалов [5]. В свою очередь, токсичность свободного Zn^{2+} обусловлена его высоким сродством к различным аминокислотным остаткам, например, гистидина и цистеина, что позволяет ему связываться с многими белками даже в наномолярных концентрациях и в итоге приводит к ингибированию ферментов или индукции белок-белковых взаимодействий [2]. Механизмы, которые клетки выработали, чтобы контролировать этот тонкий баланс, зависят от типа иона металла и могут отличаться между организмами. Известно, что клеточный гомеостаз Zn^{2+} термодинамически контролируется путем буферизации внутриклеточной концентрации свободного Zn^{2+} при уровне, достаточном для обеспечения Zn-связывающих белков, но ниже порогового (токсичного). В то время как концентрация лабильного Zn^{2+} в цитозоле определена достоверно, в субклеточных органеллах она сильно варьирует в зависимости от выбранного метода анализа цинкового пула [1].

Чтобы обеспечить более четкое понимание регулирования гомеостаза цинка и его роль в передаче сигналов внутри клетки, необходимы инструменты, которые позволили бы визуализировать этот уровень.Флуоресценция идеально подходит для этой цели, так как сочетает в себе высокую чувствительность и неинвазивность.Чтобы подходить для этих задач, такие флуоресцентные сенсоры должны иметь нужное сродство к Zn^{2+} в физиологических условиях, высокую селективность по отношению к цинку по сравнению с другими биодоступными металлами, а также иметь возможность транслировать сигнал о связывании Zn^{2+} в изменение интенсивности флуоресценции [4].

Цель исследования – с помощью флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM провести оценку изменения внутриклеточного лабильного пула Zn^{2+} в эритроцитах человека при действии агентов, модифицирующих цинковый гомеостаз.

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 в них накапливается более 90% элемента), а отсутствие ядра и других органелл позволяет оценить именно цитозольный пул этого микроэлемента.

Материалы и методы исследования

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

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000g в течение 15 мин и трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl (155 мМ). Инкубацию эритроцитов (1 %-ный гематокрит) с хлоридом цинка ($ZnCl_2$), внутриклеточным хелатором ионов цинка – N’,N’-тетракис-(2-пиридил-метил)-этилендиамином (TPEN), внеклеточным хелатором – диэтилентридиаминпентауксусной кислотой (DTPA) и агентом,

модифицирующий редокс-статус клетки – H_2O_2, проводили при 37ºС в течение 30 мин, 60 мин или 120 мин в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 155 мМ NaCl.

Оценку внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM. Для этого эритроциты, ресуспензированные в 10 мМ трис-HCl буфере + 155 мМ NaCl (pH 7,4) до 0,1% гематокрита, нагружали красителем в течение 30 мин при 37ºС. Зонд, несвязавшийся с эритроцитами, отмывали путем центрифугирования суспензии клеток при 2000g (10 мин), ресуспензировали в исходном буфере, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 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 (2000g, 10 мин). После этого проводили измерение интенсивности флуоресценции на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD)в FITC-H канале.

В работе представлены средние значения 3–5 независимых экспериментов в виде $x_{ср}\pm s_x$, где $x_{ср}$ – среднее значение, s_x – стандартное отклонение.

Результаты исследования и их обсуждение

Выбранный для достижения поставленной цели флуоресцентный индикатор FluoZin-3 обладает рядом преимуществ по сравнению с другими аналогами: 1) чувствительностью к низким уровням Zn^{2+} и к незначительным концентрационным изменениям (K_d=15 нМ); 2) стабильностью в присутствии окислителей; 3) относительной невосприимчивостью к колебаниям pH в физиологических условиях; 4) концентрации FluoZin-3, используемые в биологических системах, относительно малы в отличие от других аналогов (0,5 – 2 мкМ). Эстерифицированная форма (FluoZin-3 AM) способна проходить через мембрану внутрь клетки, где эндогенные эстеразы “активируют” ее с образованием свободной окисленной формы (FluoZin-3), непроницаемой для мембраны. Это приводит к аккумуляции загруженного зонда в клеточном цитозоле, что позволяет контролировать в нем даже незначительные колебания уровня Zn^{2+} [3].

В качестве агентов, модифицирующих цинковый гомеостаз в эритроцитах человека были использованы: 1) сульфат цинка, для внесения дополнительных ионов Zn^{2+} в клетку из вне; 2) хелаторы цинка TPEN и DTPA – для снижения уровня Zn^{2+} в цитозоле и на мембране клетки; 3) пероксид водорода – для моделирования состояния окислительного стресса в клетки.

В таблице 1 представлены результаты оценки изменения цитозольной концентрации лабильного цинка в эритроцитах человека с помощью FluoZin-3-AM после инкубации с выбранными Zn-модифицирующими агентами.

Установлено, что инкубация суспензии эритроцитов с $ZnSO_4$ в субгемолитических концентрациях от 10 до 500 мкМ при 37ºС в течение 2 ч *invitro* приводит к дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3 (таблица 1). Так, при воздействии $ZnSO_4$ в концентрации 10 мкМ

интенсивность флуоресценции увеличивается в среднем на 15–25%, при инкубации с 50 мкМ – на 30–45%, при инкубации с 100 мкМ – на 50–75%, а при инкубации с 500 мкМ – на 130–170%.

В свою очередь, инкубация с внутриклеточным хелатором TPEN в концентрациях 10, 25, 50 и 100 мкМ, выявила статистически достоверное дозозависимое снижение внутриклеточного пула Zn^{2+} (таблица 1). Полученный эффект зависел также от времени инкубации с TPEN – если после 30-минутного выдерживания эритроцитов с хелатором внутриклеточный уровень Zn^{2+} снижался в среднем на 10–50%, то после 60 мин – на 15–85% по отношению к контрольным клеткам (клетки, нагруженные FluoZin-3, но не обработанные TPEN) (таблица 1). При проведении сравнительного анализа хелатирующего эффекта внутриклеточного хелатора TPEN с внеклеточным хелатором DTPA (не проникает внутрь клетки) выявлены существенные различия в степени снижения внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка. Если 30-минутная инкубация эритроцитов с TPEN в концентрации 10 мкМ приводила к снижению цитозольного уровня 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% (таблица 1).

Таблица 1

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

[Агент], мкМ	Интенсивность флуоресценции FluoZin-3, %					
	$ZnSO_4$, 2 ч, 37°C	TPEN		DTPA, 0,5 ч, 37°C	H_2O_2	
		0,5 ч, 37°C	1 ч, 37°C		0,5 ч, 37°C	1 ч, 37°C
0	100	100	100	100	100	100
10	128,8± 10,0	97,01± 1,67	80,08± 5,25	99,0± 3,4	–	–
25	–	86,11± 1,95	76,13± 2,25	95,1± 3,3	106,97± 6,67	113,46± 5,25
50	132,5± 13,0	75,05± 3,04	50,01± 3,18	87,3± 3,6	–	–
100	166,1± 15,0	53,00± 3,62	19,04± 4,56	76,1± 4,8	107,25± 1,95	128,37± 2,25
500	254,5± 25,0	–	–	–	119,95± 3,04	145,19± 3,18
1000	–	–	–	–	132,96± 3,62	171,63± 4,56

За 100% принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах (контроль)

Инкубация эритроцитов человека с H_2O_2 в концентрациях от 30 до 1000 мкМ, как показано в таблице 1, приводит к статистически достоверному дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3, свидетельствующему об увеличении внутриклеточного пула Zn^{2+}. Так, при воздействии H_2O_2 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 – на 30–40%. Полученный эффект зависит также от времени воздействия H_2O_2 – если после 30-минутной инкубации эритроцитов с H_2O_2 внутриклеточный уровень Zn^{2+} увеличивается в среднем до 35%, то после 60 мин – до 70% по отношению к интактным клеткам (таблица 1).

Выводы

Таким образом, показано, что уровень внутриклеточного лабильного пула цинка – это динамическая система, которая изменяется в ответ на внешние стимулы. Использование флуоресцентного красителя FluoZin-3 AM является чувствительным методом для оценки изменения цитозольного пула цинка в эритроцитах человека, что может иметь большую прогностическую ценность при диагностике патологий, патогенез которых ассоциирован с нарушением метаболизма цинка (напр.: сахарный диабет II типа).

Список литературы:

1.Гармаза Ю.М. Мембранные транспортные системы для поддержания гомеостаза цинка в клетках млекопитающих / Ю.М. Гармаза, К.А. Захарова, Е.И. Слобожанина // Новости медико-биологических наук. – 2019. – Т.19, №3. – С. 84-106

2.Гармаза Ю.М. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты / Ю.М. Гармаза, Е.И. Слобожанина // Биофизика. – 2014. – Т. 59, Вып. 2. – С. 322-337

3.Гармаза Ю.М. Метод оценки изменения внутриклеточного пула цинка в эритроцитах человека с помощью флуоресцентного зонда FluoZin-3 / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Е.И. Слобожанина // Биохимия и молекулярная биология. – 2018. – Вып. 2. – С. 51-54

4.Dean K.M. Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes / K.M. Dean, Y. Qin, A.E. Palmer // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1823. – P. 1406-1415

5.Valko M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T. Cronin // Curr. Med. Chem. – 2005. – Vol. 12. – P. 1161-1208

УДК 577.24

Десятова М.А., Пономарев А.И., Коротков А.В., Макеев О.Г.