

Литература

1. Liu, Z. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: *In vitro* and *in vivo* Detection, Imaging and Drug Delivery / Z. Liu [et al.] // Nano Res. – 2009. – Vol. 2. – P. 85–120.
2. He, H. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine / H. He [et al.] // BioMed Research International. – 2013. – Article ID 578290.
3. Veronica, M. Raman intensity measurements of single-walled carbon nanotube suspensions as a quantitative technique to assess purity / M. Veronica [et al.] // Carbon. – 2010. – 48. – P. 2873–2881.
4. Bertulli, C. Spectroscopic characterization of protein-wrapped single-wall carbon nanotubes and quantification of their cellular uptake in multiple cell generations/ C. Bertulli, et. al.// Nanotechnology. – 2012. – 24. – P. 265102.
5. Shuba, M. C. Soft cutting of single-wall carbon nanotubes by low temperature ultrasonication in a mixture of sulfuric and nitric acids/M. Shuba [et al.] // Nanotechnology. – 2012. – 23. – P. 495714.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ РЕДОКС-БАЛАНСА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

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

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларусь»,
Минск, Беларусь, e-mail: garmaza@yandex.ru*

Металлотионеины (MTs) млекопитающих представляют собой суперсемейство неэнзиматических полипептидов (61–68 аминокислотных остатков), которые обнаружены во всех эукариотических клетках и некоторых прокариотах и характеризуются небольшой молекулярной массой (6–7 кДа), характерным аминокислотным составом (большим содержанием цистеина) и высоким содержанием серы и металлов (тиолатные кластеры металлов) [1]. *In vivo* они связывают Zn^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} и Hg^{2+} , в то время как *in vitro* такие металлы, как Ag^+ , Au^+ , Bi^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} и Tc^{4+} дополнительно могут быть присоединены к апотионеину (свободная от металла форма). Однако при физиологических условиях MTs содержат преимущественно Zn^{2+} [1]. Биологические функции MTs разнообразны. К ним относятся: взаимодействие с глутатионом и обеспечение процессов,

протекающих с Zn-содержащими белками, регуляция экспрессии генов с помощью Zn-зависимого фактора транскрипции, контроль роста и развития нейронов, участие в поддержании гомеостаза таких эссенциальных элементов как Cu и Zn, связывание токсичных тяжелых металлов, а также участие в обеспечении работы антиоксидантной системы. Большинство своих физиологических функций MTs осуществляет благодаря способности предоставлять биодоступный цинк участникам биохимических реакций [1]. Существует предположение, что MTs могут быть использованы также в диагностике, профилактике и при лечении ряда патологий, однако необходимые фундаментальные знания для разработки эффективных и доступных лабораторных способов оценки патологических состояний организма человека с использованием в качестве биоиндикаторов структурно-функциональных свойств металлотионеинов в настоящее время отсутствуют.

Цель работы – сравнительное исследование содержания цистеин-обогащенных белков металлотионеинов и уровня восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах человека при изменении их редокс-состояния.

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров в консерванте “тепарин”, полученная из ГУ “РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий”. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифugирования крови при 1500g, 15 мин. Инкубацию эритроцитов (0,1 %-ый гематокрит) с пероксидом водорода, внутриклеточным хелатором цинка – N’,N’-тетракис-(2-пиридинил-метил)-этилендиамин (TPEN) и внеклеточным хелатором диэтилентриамиинпентауксусной кислотой (DTPA) в субгемолитических концентрациях проводили при 37°C в течение 30 или 60 мин в 10 mM трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,155 mM NaCl. Оценка внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка была проведена с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM (Sigma). Уровень GSH в эритроцитах определяли спектрофотометрически по методу Эллмана. Оценка содержания металлотионеинов в эритроцитах проводилась с помощью моноклональных антител UC1MT (Abcam), а в качестве изотипического контроля был использован IgG1. Цитофлуориметрический анализ проводили на FACSCanto II (Beckton Dickinson) в FITC-Н канале, а спектрофотометрический – на спектрофотометре Specord M-40.

Известно, что MTs являются маркерами окислительного стресса, как на уровне мРНК, так и на белковом уровне. Ранее при изучении синтеза GSH и MTs, а также их антиоксидантных свойств продемонстрировано, что MTs совместно с GSH участвуют в поддержании клеточного редокс-

состояния [2]. В связи с этим нами изучено изменение уровня металлотионеинов в эритроцитах человека в условиях окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 (0,5 мМ). Установлено, что при моделировании в эритроцитах человека окислительного стресса путем воздействия H_2O_2 в течение 30 мин происходит увеличение уровня металлотионеинов в клетках. Если в интактных эритроцитах процент связывания антител UC1MT с MTs составил в среднем $5,4 \pm 1,3\%$, то в клетках после воздействия H_2O_2 – $15,1 \pm 3,7\%$. В то же время, уровень GSH в эритроцитах человека при данных условиях значительно снижается до $0,35 \pm 0,06$ мМ (при его уровне в интактных клетках $0,95 \pm 0,02$ мМ), а уровень внутриклеточного лабильного цинка увеличивался в среднем на 17–23%.

Существует достаточно доказательств того, что недостаток ионов цинка в организме человека сопровождается неконтролируемой генерацией активных форм кислорода, которая индуцирует повреждение белков, липидов и ДНК. ДНК–повреждения, в свою очередь, могут приводить к мутациям и это объясняет эпидемиологическую связь между дефицитом цинка и хроническими заболеваниями, в том числе и злокачественными новообразованиями [3]. Нами проведена оценка уровня MTs в эритроцитах человека при моделировании состояния дефицита цинка *in vitro* с помощью хелаторов TPEN и DTPA, т.е. в условиях смещения окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей. Показано, что уровень MTs увеличивается, как при внутриклеточном хелатировании Zn^{2+} , так и при внеклеточном. Так, инкубация клеток с TPEN (50 мкМ) в течение 60 мин (37°C) приводила к увеличению процента связывания эритроцитов с антителами против MTs – UC1MT до $29,8 \pm 5,4\%$, а после воздействия мембрононпроницаемого хелатора DTPA при тех же условиях – до $19,3 \pm 2,7\%$ (в интактных клетках этот параметр составлял $5,4 \pm 1,3\%$). При этом оценка изменения внутриклеточного уровня лабильного цинка и содержания GSH в эритроцитах человека в условиях внутриклеточного хелатирования Zn^{2+} с помощью TPEN выявила снижение как уровня Zn^{2+} в среднем на 47–53%, так и содержания GSH на 18–22% (с $0,94 \pm 0,02$ мМ в нативных эритроцитах до $0,75 \pm 0,02$ мМ в Zn^{2+} истощенных клетках).

Таким образом, изменение редокс-состояния и цинкового гомеостаза эритроцитов человека путем воздействия на клетки классического окислителя H_2O_2 , запускающего высвобождение Zn^{2+} из внутриклеточных депо, и агентов, истощающих внутриклеточный Zn^{2+} – TPEN и DTPA, сопровождается увеличением в клетках уровня цистеин-содержащих белков металлотионеинов на фоне значительного снижения уровня внутриклеточного цинка.

точного GSH, что подтверждает предположение о функционировании металлотионеинов в качестве дополнительной системы антиоксидантной защиты эритроцитов.

Работа выполнена в рамках ГПНИ “Фундаментальные основы биотехнологий” (задание № 1.30) и гранта БРФФИ № Б14М-066.

Литература

1. Гармаза, Ю.М. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Е.И. Слобожанина // Известия Национальной академии наук Беларусь. Сер. биол. наук. – 2016. – № 1. – С. 107–116.
2. Nordberg, J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system / J. Nordberg, E.S.J. Arner // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 31. – P. 1287–1312.
3. Eide, D.J. The oxidative stress of zinc deficiency / D.J. Eide // Metallomics. – 2011. – Vol. 3. – P. 1124–1129.

МОДЕЛЬ ПАРНОЙ ФАСИЛИТАЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В ГИППОКАМПЕ

Глецевич М.А., Булай П.М., Питлик Т.Н., Черенкевич С.Н.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В настоящее время изучение синаптической пластичности представляет большой интерес для фундаментальных и прикладных областей нейронаук, поскольку это свойство синапсов лежит в основе формирования памяти.

Целью нашей работы являлось математическое описание одного из видов кратковременной синаптической пластичности – парной фасилитации (ПФ). ПФ представляет собой увеличение амплитуды синаптического тока в ответ на второй из пары возбуждающих импульсов, когда интервал между возбуждающими импульсами составляет от 20 до 500 мс [1]. Моделирование ПФ проводилось на базе математической модели, разработанной для возбуждающих синапсов гиппокампа [2].

С использованием разработанной модели был проведен анализ зависимости степени ПФ от параметров, характеризующих динамику переходо-