

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИНАМИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПУЛА ИОНОВ ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА FluoZin-3

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

УДК 577.336

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
220072, Минск, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru

(Поступила 16 июля 2020)

*Продемонстрирован биофизический подход для определения динамики лабильного пула ионов цинка в эритроцитах человека в диапазоне 1—1000 нМ с помощью флуоресцентного зонда FluoZin-3. Метод может быть использован при проведении медико-биологических исследований и стать основой для разработки способов диагностики или прогнозирования течения заболеваний, связанных с нарушением метаболизма цинка.*

**Ключевые слова:** эритроциты человека, лабильный пул ионов цинка, флуоресцентный метод.

*We demonstrate a biophysical approach for estimation of the dynamics of a labile pool of zinc ions in human erythrocytes in the range from 1 to 1000 nM using a FluoZin-3 fluorescent probe. This method can be used in biomedical research and become the basis for developing methods for diagnosing or predicting the disease course associated with failure in zinc metabolism.*

**Keywords:** human erythrocytes, labile zinc pool, fluorescent method.

**Введение.** Поддержание клеточного баланса ионов переходных металлов, таких как железо, медь и цинк, является непростой задачей для всех живых организмов. За счет уникальных химических свойств данные ионы способны выступать в качестве кофакторов многочисленных ферментов и белков, что отражается на их относительно высокой суммарной клеточной концентрации 1—100 мМ [1]. В то же время известно, что в свободной форме железо, медь и цинк проявляют определенную токсичность. Например, токсичность железа и меди в основном связана с их участием в окислительно-восстановительных реакциях, что делает их мощными катализаторами при образовании свободных радикалов [1]. Токсичность свободного  $Zn^{2+}$  обусловлена его высоким сродством к различным аминокислотным остаткам, например гистидину и цистеину, что позволяет ему связываться со многими белками даже в наномолярных концентрациях и в итоге приводит к ингибированию ферментов или индукции белок-белковых взаимодействий [1—3]. Поэтому в процессе эволюции живые организмы выработали жесткую систему молекулярно-мембранных механизмов на клеточном уровне, позволяющую поддерживать оптимальное соотношение эссенциальных металлов в клетке и зависящую от их типа, а также видового разнообразия организмов [4].

Известно, что поддержание клеточного гомеостаза  $Zn^{2+}$  осуществляется путем буферизации внутриклеточной концентрации свободных ионов цинка при уровне, способном обеспечить Zn-связывающие участки белков, но ниже токсичного [5]. Несмотря на то что во многих животных клетках существует сложная регуляторная система, обеспечивающая поддержание физиологического уровня цитозольного  $Zn^{2+}$ , размер его внутриклеточного пула может быстро изменяться из-за повышенного поступления или дефицита ионов, что становится причиной нарушения многих биохимических процессов [6].

---

## DETERMINATION OF THE DYNAMICS OF THE INTRACELLULAR POOL OF ZINC IONS IN HUMAN ERYTHROCYTES USING A FLUORESCENT PROBE FluoZin-3

Y. M. Harmaza\*, A. V. Tamashevski, E. I. Slobozhanina (Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru)

Для более четкого понимания процессов контроля гомеостаза ионов цинка и его роли в передаче сигналов внутри клетки необходимы методические подходы, которые позволяют визуализировать и регулировать уровень  $Zn^{2+}$  или его изменение. Выбор таких подходов должен опираться на несколько ключевых факторов: время анализа; требуемую точность; стоимость; пул ионов цинка, который необходимо определить (общий, лабильный или свободный), и его субклеточную локализацию (цитозоль, органеллы — комплекс Гольджи, митохондрии и др.) [7]. Метод флуоресценции идеально подходит для таких задач, поскольку сочетает высокую чувствительность и экспрессность. Флуоресцентные соединения должны иметь нужное сродство к ионам металла в физиологических условиях, высокую селективность по отношению к ним по сравнению с другими биодоступными металлами, а также обладать возможностью транслирования сигнала о связывании с исследуемым металлом в значительное увеличение интенсивности своей флуоресценции [7, 8].

Долгое время основной проблемой в изучении цинковой сигнализации было отсутствие чувствительных и специфических флуоресцентных соединений для визуализации динамических изменений  $Zn^{2+}$  *in vitro* и *in vivo*. В последнее десятилетие произошел большой прогресс в разработке новых цинк-селективных флуоресцентных зондов и хелаторов, которые позволили заглянуть в “окно” клеточной биологии цинка. Если провести параллель с научными открытиями в области кальциевой сигнализации в 1980-х гг., то они начались после разработки ратиометрического зонда фура-2, который помог дифференцировать  $Ca^{2+}$  от  $Mg^{2+}$ , а также селективного кальциевого хелатора ВАРТА [9]. Аналогичная работа проведена несколькими группами химиков по разделению двух других ионов ( $Zn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ) в 2000-х гг., что привело к синтезу ряда флуоресцентных зондов на ионы цинка, таких как Newport green, FluoZin-3, znpug-1, chromis-1, а также генетически кодированных цинковых сенсоров [10—14].

Цель настоящей работы — разработка чувствительного и простого способа определения изменения внутриклеточной концентрации лабильного пула ионов цинка (пул свободных и слабосвязанных ионов) в эритроцитах человека с помощью флуоресцентного зонда FluoZin-3, который способен значительно изменять свои эмиссионные свойства при связывании данного элемента.

Эритроциты человека выбраны в качестве объекта исследования, так как они являются подходящими клетками для оценки статуса ионов цинка в организме (при попадании соединений цинка в кровь человека в них накапливается >90 % элемента), а отсутствие ядра и других органелл позволяет оценить именно цитозольный лабильный пул этого микроэлемента.

Концентрация свободных ионов цинка в клетках крови (в том числе в эритроцитах) составляет ~1 пМ [15], уровень лабильного цитозольного цинка колеблется около 1 нМ [16]. Для достижения поставленной цели выбран FluoZin-3, обладающий рядом преимуществ по сравнению с другими аналогами (FluoZin-1, FluoZin-2, RhodZin-3, Newport Green) [11, 17, 18]: чувствительностью к низким уровням содержания  $Zn^{2+}$  и к незначительным концентрационным изменениям ( $K_d = 15$  нМ при pH 7.4); стабильностью в присутствии окислителей (например, пероксинитрита); относительной невосприимчивостью к колебаниям pH в физиологических диапазонах; концентрации FluoZin-3, используемые в биологических системах (0.5—2 мкМ), относительно малы в отличие от других аналогов; длина волны возбуждения FluoZin-3 аналогична флуоресцеину, что делает возможным измерение флуоресцентных характеристик этого зонда на многих специализированных приборах (спектрофлуориметре, проточном цитометре, флуоресцентном и конфокальном микроскопе и др.).

В качестве аналога предлагаемого метода взят подход [17, 18] разработчиков флуоресцентного индикатора FluoZin-3. К недостаткам данного подхода можно отнести следующее: не подобраны точные условия работы с флуоресцентным зондом для его встраивания в клетки крови (температура и время инкубации, концентрация, буферная система); для пересчета концентрации ионов цинка предложены способы, требующие дополнительных реактивов (хелатора ионов цинка, ионофора для ионов цинка, флуоресцентного зонда mag-fura-5), времени и специальной методической подготовки для выполнения исследований.

**Эксперимент.** Периферическая кровь условно здоровых доноров в консерванте “гепарин” получена из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования цельной крови при 2000g в течение 10 мин. Затем клетки промывали три раза при тех же условиях в физиологическом растворе (0.155 М) NaCl; ресуспендировали в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7.4), содержащем 0.155 М NaCl (буфер А) до 0.2 % гематокрита и нагружали флуоресцентным зондом FluoZin-3-AM в конечной концентрации 2 мкМ в течение 30 мин при постоянном перемешивании (37 °C). Исходный раствор FluoZin-3-AM в концентрации 2 мМ при-

готовлен в диметилсульфоксиде (ДМСО), аликвота зонда была разведена в буфере А, содержащем 20 %-ную плуроновою кислоту F-127. Зонд, не связавшийся с эритроцитами, отмывали путем центрифугирования суспензии клеток при 2000g в течение 10 мин, далее клетки ресуспендировали в исходном буфере А, содержащем 0.3 % бычьего сывороточного альбумина (БСА), инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте и дважды отмывали (2000g, 10 мин) в буфере А. Далее к клеткам добавляли 2 мл буфера А и помещали в кварцевую кювету для измерения интенсивности флуоресценции FluoZin-3, которую регистрировали на спектрофлуориметре при  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{рег}} = 494/516$  нм.

Для изучения транспорта ионов цинка в кювету вносили 0.5 мл суспензии эритроцитов (0.2 %-й гематокрит), нагруженных зондом FluoZin-3 AM, как описано выше, после чего создавали различные экспериментальные условия для модификации цинкового гомеостаза клетки: добавляли сульфат цинка (100 мкМ), цинковый ионофор Na-пиритион (25 мкМ), внутриклеточный хелатор цинка N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамином (TPEN, 25 мкМ). После этого прописывали кинетики флуоресценции FluoZin-3 при  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{рег}} = 494/516$  нм.

Для исследования изменений внутриклеточного пула ионов цинка в эритроцитах человека проводили их инкубацию (10 %-й гематокрит) с сульфатом цинка в субгемолитических концентрациях (10—500 мкМ) в течение 2 ч в буфере А *in vitro* (37 °С). После инкубации эритроцитов в среде, содержащей сульфат цинка, клетки отмывали путем центрифугирования при 2000g в течение 10 мин при температуре 2—4 °С, супернатант удаляли, а эритроциты ресуспендировали в исходном буфере А.

С целью перехода от абсолютных (приборных) величин интенсивности флуоресценции FluoZin-3 (отн. ед.) в количественные изменения концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  (нМ) построена калибровочная кривая с использованием зонда FluoZin-3-TS. Для этого в кювету, содержащую 10 мМ трисHCl буфер (pH 7.4) и зонд FluoZin-3-TS концентрацией 1 мкМ, последовательно добавляли раствор сульфата цинка в концентрациях от 1 до 5000 нМ и прописывали кинетику флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{рег}} = 494/516$  нм. Затем строили калибровочную кривую зависимости изменения интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от концентрации  $\text{Zn}^{2+}$ .

Специфичность зонда FluoZin-3 к ионам цинка изучали следующим образом: в кювету, содержащую 10 мМ трисHCl буфер (pH 7.4) и зонд FluoZin-3-TS концентрацией 1 мкМ, добавляли физиологические концентрации сульфата цинка (1 мкМ), хлорида кальция (2 мМ) и хлорида магния (2 мМ). После этого прописывали кинетики флуоресценции FluoZin-3 при  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{рег}} = 494/516$  нм.

Растворы, используемые для построения калибровочной кривой и при определении внутриклеточной концентрации ионов цинка в эритроцитах, приготовлены из деионизированной воды mQ (удельное сопротивление 18.2 М·Ом·см) и солей металлов со степенью очистки >99.5 %.

Использованы следующие химические реактивы: 2-меркаптопиридин N-оксид-Na (Na-пиритион), TPEN, плуроновая кислота F-127, ДМСО, сульфат цинка (Sigma); FluoZin-3 AM и FluoZin-3 TS (Molecular Probes); БСА (Serva); трис-(оксиметил)-аминометан (Aplichem); хлорид натрия, хлорид магния, хлорид кальция (“Реахим”). Все флуоресцентные измерения выполнены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия).

**Результаты и их обсуждение.** Существуют две формы флуоресцентного индикатора FluoZin-3. Водорастворимая форма (FluoZin-3 TS) флуоресцирует в растворе и не проницаема для клеточной мембраны (использована для построения калибровочной кривой). Эстерифицированная форма (FluoZin-3 AM) способна проникать через клеточную мембрану, где эндогенные эстеразы “активируют” ее с образованием свободной окисленной формы (FluoZin-3), не проницаемой для мембраны. Это приводит к аккумуляции загруженного зонда в клеточном цитозоле, что позволяет контролировать в нем даже незначительные колебания содержания ионов цинка [11, 17]. В данном исследовании эстерифицированная форма FluoZin-3 использована при работе с эритроцитами человека.

Поскольку внутриклеточный уровень свободных ионов цинка ( $10^{-11}$  М) на несколько порядков ниже физиологического уровня ионов кальция ( $10^{-7}$  М) и магния ( $10^{-4}$  М) [19], а FluoZin-3 имеет три карбоксильные группы вместо четырех, как у классического  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатора, для сохранения высокой аффинности к ионам цинка и для ее снижения к ионам кальция [20], на первом этапе работы с данным зондом проверено влияние физиологических концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  на интенсивность его флуоресценции, чтобы исключить их вклад в интерпретацию итоговых результатов. Из рис. 1, а видно, что при добавлении хлорида кальция в концентрации 2 мМ в 10-мМ трисHCl буфер, содержащий 1 мкМ FluoZin-3 TS, интенсивность флуоресценции FluoZin-3 возрастает в среднем на 3—5 %, а при добавлении хлорида магния концентрацией 2 мМ происходит ее незначительное

снижение — возможный результат эффекта разведения. В то же время добавление сульфата цинка концентрацией 1 мкМ в систему буферный раствор+зонд приводит к резкому увеличению интенсивности флуоресценции FluoZin-3. Таким образом, ионы магния в физиологической концентрации не оказывают влияния на интенсивность флуоресценции FluoZin-3, а ионы кальция вносят незначительный вклад в итоговую интенсивность флуоресценции FluoZin-3.

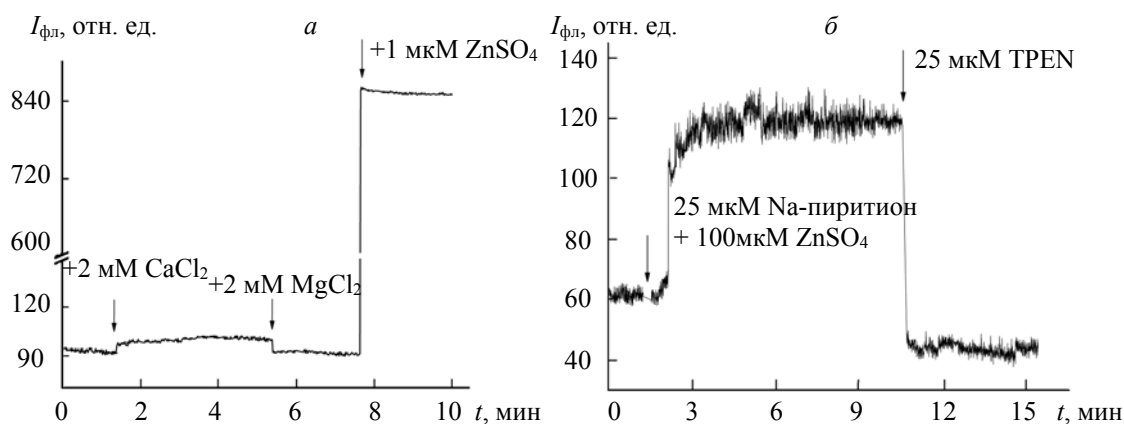


Рис. 1. Кинетика интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в 10-мМ трис-НСl буфере до и после изменения его ионного состава (а) и встроенного в интактные эритроциты человека до и после модификации их цинкового гомеостаза (б)

Проведены эксперименты по изучению ответа зонда FluoZin-3 на модификацию цинкового баланса в интактных эритроцитах человека. Из рис. 1, б видно, что при добавлении в суспензию эритроцитов, предварительно нагруженных FluoZin-3 АМ, комбинации  $ZnSO_4$ +Na-пиритион зонд реагирует мгновенно, увеличивается интенсивность его флуоресценции, так как присутствие цинкового ионофора (Na-пиритиона) в среде инкубации клеток позволяет ионам цинка быстро проходить сквозь цитоплазматическую мембрану во внутриклеточное пространство. В то же время при добавлении мембранопроницаемого внутриклеточного хелатора цинка TPEN, который обладает высокой аффинностью к  $Zn^{2+}$  ( $3.8 \cdot 10^{15} M^{-1}$ ) [21], снижается интенсивность флуоресценции FluoZin-3 до уровня ниже базального. Эти результаты демонстрируют, что флуоресцентный зонд FluoZin-3 быстро реагирует на модификацию внутриклеточного лабильного пула ионов цинка и его можно использовать для решения поставленных задач.

На следующем этапе непосредственно разработан флуоресцентный подход к определению изменения внутриклеточной концентрации лабильного пула ионов цинка с помощью FluoZin-3. К основным критериям разработки отнесены доступность используемого метода и диапазон его чувствительности. Чтобы экспериментально увеличить внутриклеточное содержание ионов цинка в эритроцитах условно здоровых доноров, проведена их предынкубация с сульфатом цинка в субгемолитических концентрациях (10—500 мкМ) в течение 2 ч *in vitro*. Соответствующий диапазон концентраций выбран исходя из того, что используемые количества сульфата цинка не вызывали гемолиза эритроцитов при выбранном времени инкубации (2 ч), а данные концентрации являются физиологическими (10 мкМ), фармакологическими (50 и 100 мкМ) и токсичными (500 мкМ) для клеток крови человека *in vitro* [22, 23]. Далее согласно протоколу, описанному выше, в интактные и Zn-модифицированные эритроциты был загружен флуоресцентный зонд FluoZin-3 АМ и зарегистрированы спектры эмиссии флуоресценции FluoZin-3 (рис. 2, а). Как видно из рис. 2, б, инкубация эритроцитов с сульфатом цинка в выбранном диапазоне концентраций в течение 2 ч приводит к дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3. Так, при воздействии  $ZnSO_4$  концентрацией 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 % относительно интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных клетках.

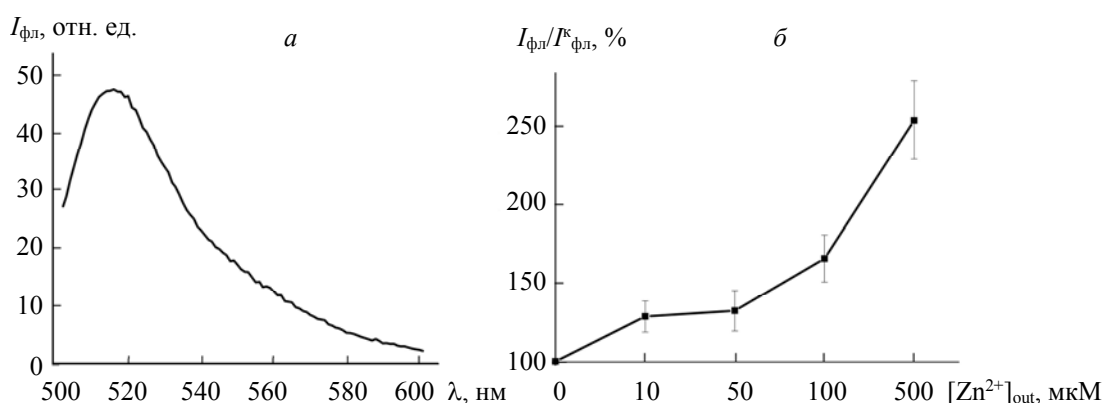


Рис. 2. Типичный спектр флуоресценции FluoZin-3, встроенного в эритроциты человека (а), и зависимость его относительной интенсивности флуоресценции от содержания ионов цинка в среде инкубации клеток (б); за 100 % принята интенсивность флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах в отсутствие сульфата цинка в среде инкубации (контроль); представлены средние значения шести экспериментов ( $x_{\text{ср}} \pm S_x$ );  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{рег}} = 494/516$  нм

С целью количественного пересчета изменения концентрации ионов цинка в Zn-модифицированных эритроцитах построена калибровочная кривая с использованием водорастворимой формы флуоресцентного зонда FluoZin-3 — FluoZin-3-TS. Для этого в кювету, содержащую 10 мМ трисHCl буфера и 1 мкМ зонда FluoZin-3-TS, последовательно добавляли сульфат цинка в концентрациях 0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 1000, 2000, 5000 нМ и прописывали кинетику флуоресценции FluoZin-3 при  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{рег}} = 494/516$  нм в среднем по 150 с на каждую точку (рис. 3).

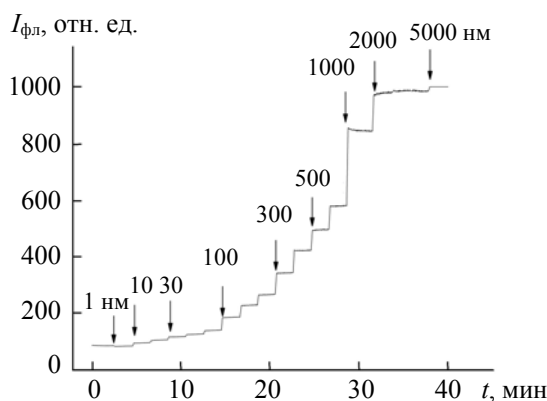


Рис. 3. Кинетика флуоресценции FluoZin-3 в 10-мМ трис-HCl буфере при увеличении концентрации сульфата цинка в буферной среде

Для перехода от кинетических кривых к средней интенсивности флуоресценции FluoZin-3 после добавления определенной концентрации ионов цинка определяли частное от деления площади под кинетической кривой на количество секунд, в течение которых регистрировали интенсивность флуоресценции. Итоговый результат (рис. 4, а) представляет собой калибровочную кривую в виде отношения разности интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в экспериментальном образце ( $I$ ) и интенсивности флуоресценции образца в отсутствие FluoZin-3 ( $I_0$ ) к интенсивности флуоресценции образца в отсутствие FluoZin-3 ( $I_0$ ). Из представленных калибровочных кривых (рис. 4) видно, что предлагаемый подход позволяет определить динамику концентрации лабильных ионов цинка в клетках в диапазоне 1—1000 нМ.

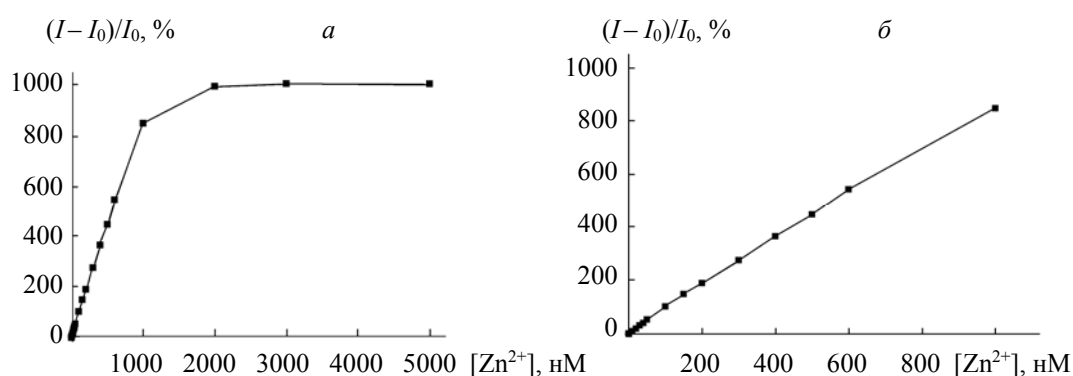


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения изменения внутриклеточной концентрации лабильного пула ионов цинка в клетках

С использованием линейного участка построенной калибровочной кривой (рис. 4, б) проведен пересчет полученных ранее относительных интенсивностей флуоресценции FluoZin-3 (рис. 2, б) и установлено, что после инкубации суспензии эритроцитов с  $\text{ZnSO}_4$  в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 2 ч *in vitro* внутриклеточная концентрация лабильных ионов цинка в них увеличивалась в среднем на 17—26, 30—43, 48—73 и 131—177 нМ соответственно.

**Заключение.** Результаты исследований позволили выявить особенности флуоресцентного метода оценки изменения внутриклеточного пула лабильных ионов цинка в эритроцитах человека с помощью FluoZin-3. Продемонстрирована чувствительность индикатора к низким уровням концентрации микроэлемента и незначительным изменениям содержания его лабильного пула. Установлено, что физиологические концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  практически не влияют на интенсивность флуоресценции FluoZin-3 и, соответственно, не способны вносить вклад в интерпретацию итоговых результатов, что свидетельствует о высокой специфичности выбранного метода. Предлагаемый подход позволяет зарегистрировать изменение концентрации лабильных ионов цинка в эритроцитах человека в диапазоне 1—1000 нМ. Для определения изменения уровня лабильных ионов цинка предлагаемым способом достаточно небольшого количества биологического материала (в 1 мкл крови содержится ~1 млн эритроцитов).

Полученные результаты положены в основу патента “Способ количественного определения в эритроцитах содержания лабильных ионов цинка” [24]. Разработанный способ может быть использован для медицинских целей при создании методов оценки воздействия повышенных концентраций  $\text{Zn}^{2+}$  на клетки крови человека (например, при проведении “цинковой терапии”) [2], а также методов коррекции патологий, вызванных дисбалансом цинка в организме человека (например, кардиологические болезни) [6, 25].

- [1] M. Valko, H. Morris, M. T. Cronin. *Cur. Med. Chem.*, **12** (2005) 1161—1208
- [2] Ю. М. Гармаза, Е. И. Слобожанина. *Биофизика*, **59**, вып. 2 (2014) 322—337 [Y. M. Harmaza, E. I. Slobozhanina. *Biophysics*, **59**, N 2 (2014) 264—275]
- [3] W. Maret. *Biochemistry*, **43**, N 12 (2004) 3301—3309
- [4] K. Bowers, S. K. Singh Srani. *Traffic*, **19** (2018) 813—822
- [5] A. Krezel, W. Maret. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11** (2006) 1049—1062
- [6] Ю. М. Гармаза, К. А. Захарова, Е. И. Слобожанина. *Новости мед.-биол. наук*, **19**, № 3 (2019) 84—106 [Y. M. Harmaza, K. A. Zakharova, E. I. Slobozhanina. *News Biomed. Sci.*, **19**, N 3 (2019) 84—106]
- [7] K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer. *Chem. Rev.*, **114** (2014) 4564—4601
- [8] D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang. *Nat. Chem. Biol.*, **4** (2008) 168—175
- [9] R. Y. Tsien. *Biochemistry*, **19**, N 11 (1980) 2396—2404
- [10] D. Bourassa, C. M. Elliott, A. M. McCallum, S. Sumalekshmy, R. L. McRae, M. T. Morgan, N. Siegel, J. W. Perry, P. A. Rosenberg, C. J. Fahrni. *ACS Sens.*, **3**, N 2 (2018) 458—467

- [11] **K. R. Gee, Z.-L. Zhou, D. Ton-That, S. L. Sensi, J. H. Weiss.** *Cell Calcium*, **31**, N 5 (2002) 245—251
- [12] **D. Y. Zhang, M. Azrad, W. Demark-Wahnefried, C. J. Frederickson, S. J. Lippard, R. J. Radford.** *ACS Chem. Biol.*, **10** (2015) 385—389
- [13] **J. G. Park, Y. Qin, D. F. Galati, A. E. Palmer.** *ACS Chem. Biol.*, **7** (2012) 1636—1640
- [14] **J. L. Vinkenborg, T. J. Nicolson, E. A. Bellomo, M. S. Koay, G. A. Rutter, M. Merks.** *Nat. Methods*, **6** (2009) 737—740
- [15] **T. J. Simons.** *J. Membr. Biol.*, **123** (1991) 63—71
- [16] **D. J. Eide.** *Biochim. Biophys. Acta*, **1763** (2006) 711—722
- [17] **A. R. Kay.** *BMC Physiol.*, **4**, N 4 (2004) 1—9
- [18] **I. Johnson, M. T. Z. Spence.** *Molecular Probes Handbook, a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th ed., Life Technologies (2010)
- [19] **W. Maret.** *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, N 11 (2017) 6—17
- [20] **J. Zhao, B. A. Bertoglio, K. R. Gee, A. R. Kay.** *Cell Calcium*, **44**, N 4 (2008) 422—426
- [21] **H. Haase, S. Hebel, G. Engelhardt, L. Rink.** *Anal. Biochem.*, **352** (2006) 222—230
- [22] **N. Boukaïba, C. Flament, S. Acher, P. Chappuis, A. Piau, M. Fusselier, M. Dardenne, D. Lemonnier.** *Am. J. Clin. Nutr.*, **57** (1993) 566—572
- [23] **K. L. Chang, T. C. Hung, B. S. Hsieh, Y. H. Chen, T. F. Chen, H. L. Cheng.** *Nutrition*, **22**, N 5 (2006) 465—474
- [24] **Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский, Е. И. Слобожанина.** Способ количественного определения в эритроцитах содержания лабильных ионов цинка, патент № 20134 РБ, МПК С2 G01N 33/52 (2006.01) (2016)
- [25] **Y. M. Harmaza, A. V. Tamashevski, E. I. Slobozhanina.** *J. Int. OMICS*, **9**, N 1 (2019) 10—16