

ISSN 0233-4755

Том 33, Номер 1

Январь - Февраль 2016



# БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной  
и клеточной биологии*



<http://www.naukaran.ru>  
<http://www.maik.ru>



“НАУКА”

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 33, номер 1, 2016

## ОБЗОРЫ

Глия и глиальные полиамины. Роль в функционировании мозга в норме и патологии <i>С. Н. Скачков, С. М. Антонов, М. Дж. Итон</i>	3
Межклеточная сигнализация в мире микроорганизмов: панорамный вид <i>Е. О. Пучков</i>	32
***	
Стохастическая модель кинетики доменов в биологических мембранах <i>В. В. Рязанов</i>	43
Роль фрагмента дефенсинов в регулировании жирнокислотного состава фосфолипидов мембран эпителиоподобных клеток <i>В. П. Иванова, З. В. Ковалева, Е. И. Сорочинская, В. В. Анохина, А. И. Кривченко</i>	53
Изменение микрореологических свойств эритроцитов под действием препаратов химиотерапии опухолей <i>И. А. Тихомирова, А. В. Муравьев, Е. П. Петроченко, Н. В. Кислов, С. В. Чепоров, Е. В. Пеганова</i>	62
Новый синтетический пептид защищает нейроны от гибели, вызванной токсическим воздействием активированных тучных клеток, через рецептор, активируемый протеазами <i>И. И. Бабкина, С. М. Струкова, В. Г. Пинелис, Г. Райзер, Л. Р. Горбачева</i>	70
Регуляция стронцием апоптотического сигнала в иммунocyтaх <i>О. В. Долгих, Н. В. Зайцева, Д. Г. Дианова</i>	80

УДК 616-097

## РЕГУЛЯЦИЯ СТРОНЦИЕМ АПОПТОТИЧЕСКОГО СИГНАЛА В ИММУНОЦИТАХ

© 2016 г. О. В. Долгих\*, Н. В. Зайцева, Д. Г. Дианова

Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения,  
614045, Пермь, ул. Монастырская, 82;

\*e-mail: oleg@frisk.ru

Поступила в редакцию 26.03.2015 г.

Принята к печати 10.06.2015 г.

Негативное воздействие тяжелых металлов на различные органы и системы, в том числе на иммунную, может проявляться нарушением функционирования рецепторных систем и внутриклеточной сигнализации. Проанализировано участие стабильного стронция ( $\text{Sr}^{2+}$ ) на регуляцию апоптотического сигнала в иммунокомпетентной клетке. Описаны механизмы, с помощью которых стронций модулирует апоптотическую реакцию лимфоцита, охарактеризованы процессы внутриклеточной трансдукции сигнала с участием  $\text{Sr}^{2+}$ . С использованием метода проточной цитофлуориметрии определены изменения мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза у детей, употребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция. Установлено, что стронций, содержащийся в крови в концентрации 0.0129–0.173 мг/дм<sup>3</sup>, воздействует на различные пути регуляции апоптоза (CD95-, p53- и TNF-индуцируемый апоптоз) и на сайты их интеграции, способствует снижению передачи апоптотического сигнала в иммунокомпетентных клетках, формируя альтернативный путь клеточной элиминации, в основе которого лежит механизм некроза.

**Ключевые слова:** апоптотический сигнал, иммунокомпетентная клетка, стронций.

**DOI:** 10.7868/S0233475516010047

### ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные экспериментальные данные указывают на участие стабильного стронция ( $\text{Sr}^{2+}$ ) в переключении основных режимов функционирования клетки и тем самым в регуляции апоптоза [1]. При воздействии стронция происходит внеклеточная идентификация лиганда, передача сигнала через мембрану в разные компартменты клетки, его внутриклеточное распознавание с последующим включением путей активации и транслокации транскрипционных факторов, что в итоге приводит к транскрипции и экспрессии требуемых генов. В настоящее время не вызывает сомнения, что стронций вовлечен в изменение передачи апоптотического сигнала, однако механизмы его участия в регуляции летальной программы иммунокомпетентных клеток остаются недостаточно изученными.

В представленной работе изучена регуляция стронцием апоптотического сигнала в иммунокомпетентных клетках.

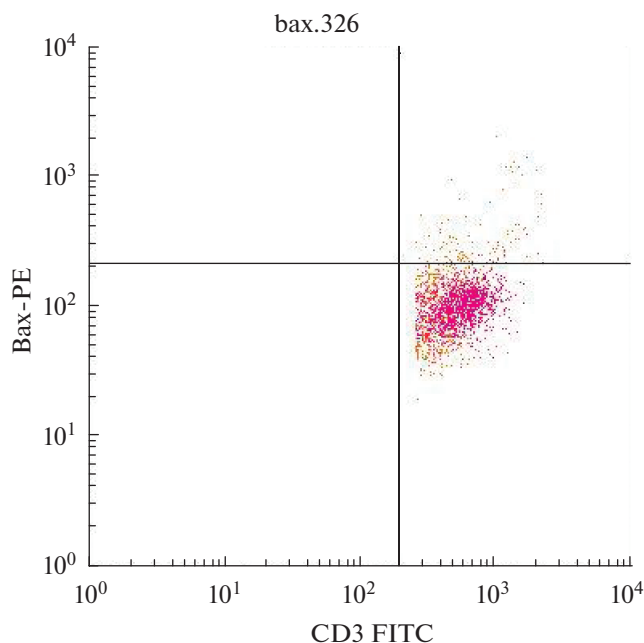
### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на примере детского населения, проживающего в условиях с различным содержанием стронция в питьевой воде. Ин-

формированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных детей подписано их родителями (опекунами). В группу наблюдения вошли 63 ребенка, потребляющих воду, содержание стронция в которой превышало норму в 1.2 раза. Группа контроля – 53 ребенка, потребляющих воду с допустимым содержанием стронция. Обе группы были сопоставимы по полу, возрасту, соматической заболеваемости. Содержание химических элементов (стронций) в крови определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в соответствии с требованиями СТО М. 12–2013.

Уровень экспрессии CD95 и TNFR1, p53, Вах (относительно количества иммунореактивных клеток) на клетках периферической крови (Т-лимфоцитах) определяли с использованием меченых моноклональных антител к соответствующему биомаркеру согласно протоколу фирмы Becton Dickinson и Wesman Coulter (BD, США и ВС, США соответственно) (рис. 1). Для определения маркеров апоптоза (мембранных и внутриклеточных) использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в течение 20 мин при 400 g (1500 об./мин) в градиенте плотности фиколла-верографина 1.077 г/см<sup>3</sup> (Pharmacia Fine





**Рис. 1.** Анализ образца крови методом проточной цитометрии с идентификацией проапоптотического фактора Вах, меченного фикоэритрином (РЕ), со значением 5.98% от общего пула Т-лимфоцитов, что ниже диапазона нормы (8–12%).

Chemicals, Швеция). Мононуклеарные клетки собирали с интерфазной поверхности и отмывали средой 199 центрифугированием при 400 г в течение 20 мин, а затем 10 мин. Число клеток подсчитывали в камере Горяева, при необходимости суспензию доводили средой 199 до рабочей концентрации  $4 \times 10^6$  клеток в 1 мл. Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC (Annexin V-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) согласно протоколу фирмы-производителя (BC, США). Тестирование осу-

ществляли на проточном цитометре FACSCalibur (BD, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий средних проверяли соответствие формы выборочных распределений нормальному, используя критерий  $\chi^2$ , а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. При отклонении от нормального распределения для сравнения данных использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. При соответствии данных нормальному распределению использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты представляли в виде среднего значения (*M*) и ошибки среднего (*m*). Во всех процедурах рассчитывали достигнутый уровень значимости (*p*), при этом критический уровень значимости принимали равным 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в крови детей группы наблюдения содержание стронция статистически значимо ( $p < 0.05$ ) выше, чем в контрольной группе и по сравнению с референсным значением (таблица). По данным цитофлуориметрического анализа экспрессии биомаркеров апоптоза количество мембранных рецепторов CD95<sup>+</sup> и TNFR1<sup>+</sup> на Т-лимфоцитах детей группы наблюдения, а также экспрессия белка p53 статистически значимо ( $p < 0.05$ ) ниже, чем в контрольной группе (рис. 2). Показано, что у детей с повышенным содержанием стронция в крови содержание (%) AnnexinV-FITC<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>-клеток превышает ( $p < 0.05$ ) этот показатель у детей, содержание стронция в крови которых находится в пределах референсного интервала. Очевидно, что стронций, поступающий в

### Маркеры эффекта в условиях различной экспозиции стронцием

Показатели	Группа контроля, ( <i>n</i> = 53), <i>M</i> ± <i>m</i>	Группа наблюдения, ( <i>n</i> = 63), <i>M</i> ± <i>m</i>
Стронций, мг/дм <sup>3</sup>	Референсные значения 0.01–0.077 [2]	
	0.035 ± 0.0048	0.151 ± 0.022 <sup>p1 = 0.001, p = 0.001</sup>
CD95 <sup>+</sup> , %	16.71 ± 4.29	12.27 ± 2.16 <sup>p = 0.040</sup>
p53, %	1.41 ± 0.75	0.65 ± 0.16 <sup>p = 0.030</sup>
TNFR1, %	0.87 ± 0.28	0.31 ± 0.13 <sup>p = 0.001</sup>
bax, %	9.94 ± 5.98	8.82 ± 5.33 <sup>p = 0.750</sup>
AnnexinV-FITC <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup> , %	2.11 ± 0.51	2.07 ± 0.42 <sup>p = 0.890</sup>
AnnexinV-FITC <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> , %	6.69 ± 0.37	9.04 ± 1.10 <sup>p = 0.049</sup>

*Примечание:* <sup>p1</sup> – отличие от референсных значений; <sup>p</sup> – отличие между контрольной группой и группой наблюдения по средним величинам.

организм с водой в количествах, статистически значимо ( $p < 0.05$ ) превышающих референсный уровень, дозозависимо влияет на трансдукцию апоптотического сигнала, в итоге модифицируя апоптотическую реакцию в иммунокомпетентных клетках (рис. 3).

При антигенной стимуляции должен работать механизм, позволяющий элиминировать клоны нефункциональных клеток и поддерживать гомеостаз в иммунной системе [3]. Одним из таких механизмов является индуцированная активация клеточной гибели по пути апоптоза. Однако если в клетках нарушены механизмы апоптоза, то клетки погибают путем некроза [4]. В то же время некротическая гибель клеток может быть не только вариантом гибели в условиях подавления апоптоза, но и способствовать активации иммунного ответа организма [4]. Индуцировать программу некроза можно путем сверхэкспрессии проапоптотического белка Вах при одновременном подавлении активности каспаз [4]. Экспериментально подтверждено, что  $Sr^{2+}$  инициирует конформационные изменения рецепторного аппарата клетки, в частности, рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) и нарушает трансмембранную передачу сигнала [5]. Не исключено также непосредственное (прямое) воздействие стронция на компоненты внутриклеточной передачи апоптотических сигналов [6, 7]. Обнаружена способность стронция ингибировать экспрессию некоторых цитокинов, в частности  $TNF\alpha$ , лиганда  $TNFR1$  [8].

Предполагается, что внеклеточный домен  $Ca$ -чувствительного рецептора ( $CaR$ ) содержит различные сайты связывания  $Sr^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . Связывание с рецептором приводит к активации различных сигнальных путей [9, 10]. Различия в сигнальных каскадах позволяет  $Sr^{2+}$  усиливать индуцированный  $Ca^{2+}$  ответ клетки, и наоборот [9]. Комплекс  $CaR$  с агонистом может активировать несколько комплексов G-белков с эффекторами и инициировать различные сигнальные пути [11]. Так  $G\alpha i$  стимулирует фосфатидилинозитол-3-киназу ( $PI3K$ ), вызывая передачу сигнала по пути  $PI3K/Akt$ . Белок  $G\alpha q$  активирует фосфолипазу C ( $PLC$ ), катализирующую распад мембранных фосфолипидов, в частности, фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата ( $PIP_2$ ) до инозитол-1,4,5-трисфосфата ( $IP_3$ ) и диацилглицерина ( $DAG$ ).  $IP_3$  вызывает выброс двухвалентных ионов кальция из внутриклеточного депо, при этом повышается внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$ .  $DAG$  под действием  $PLC$  остается связанным с мембраной и стимулирует протеинкиназу C ( $PKC$ ), запуская последовательный каскад митоген-активируемых протеинкиназ ( $MAPK$ ): киназа  $MAP$ -киназа ( $MEK$ ), регулируемая внеклеточным сигналом протеинкиназы ( $ERK-I/II$ ). Каскад  $MAP$ -киназы также вовлечен в ответ на активацию  $Ras$ . Экспериментально уста-

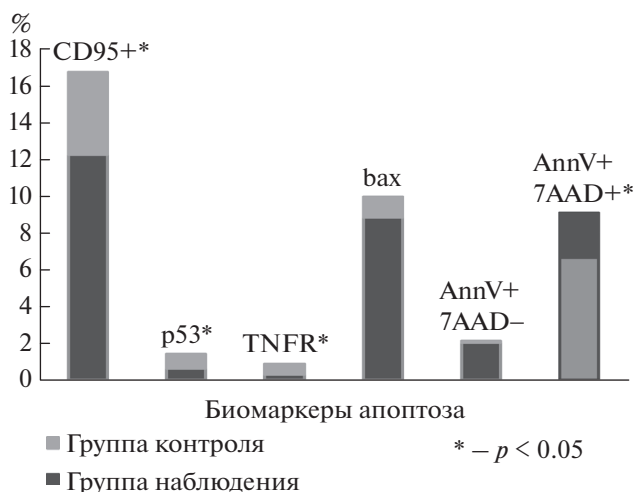


Рис. 2. Соотношение биомаркеров апоптоза (в %) в группах детей с различным уровнем экспозиции стронцием.

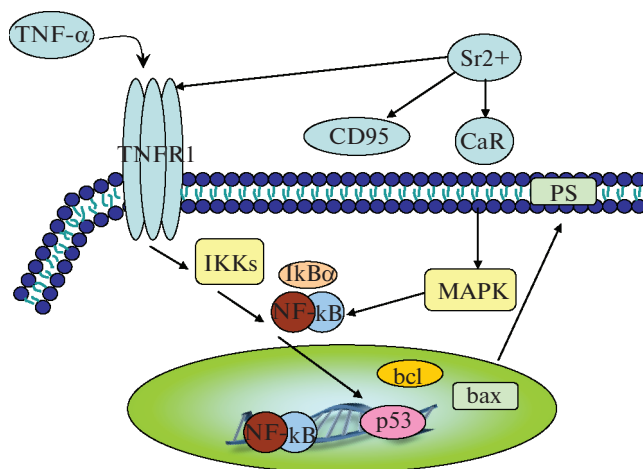


Рис. 3. Модуляция стронцием апоптотических сигнальных путей.  $MAPK$  – каскад митоген-активируемых протеинкиназ;  $CaR$  –  $Ca$ -чувствительный рецептор;  $NF-\kappa B$  – ядерный фактор транскрипции;  $IKK$  –  $I\kappa B$ -киназный комплекс;  $PS$  – фосфатидилсерин.

новлено, что  $Sr^{2+}$  повышает транслокацию  $NF-\kappa B$  (ядерный фактор  $\kappa B$ ) с участием изофермента  $PKC\beta II$  [9]. Активация  $NF-\kappa B$  приводит к повышению уровня экспрессии ингибиторов апоптоза. Однако сложность устройства и особенности транслокации  $NF-\kappa B$  в ядро позволяют клетке по-разному реагировать на всевозможные стимулы, что ведет к различным последствиям. Стронций способен трансформировать компоненты клеточных сигнальных путей независимо от  $CaR$  [12].

Выявлено прямое воздействие  $Sr^{2+}$  на  $FGFR$ , трансмембранную рецепторную тирозинкиназу ( $RTK$ ). Активация стронцием системы  $FGF/$

FGFR приводит к повышению Akt, ERK-I/II, p38 и PLC-опосредованной сигнализации [5]. Основная функция каскада протеинкиназ PI3K/Akt — предотвращение клеточной гибели. PI3-киназа вовлечена в передачу сигнала от FGFR в активированных В- и Т-клетках. В результате конформационной перестройки PI3K приобретает ферментативную активность и катализирует превращение PIP2 в PIP3, необходимый для последующих реакций фосфорилирования Akt. Akt действует путем активации фактора NF-κB [13], который подавляет p53-зависимый апоптоз в некоторых системах. Akt-зависимое фосфорилирование белка MDM2 способствует убиквитин-зависимому протеолизу белка p53 [14]. Кроме того, киназа Akt может прямо подавлять апоптоз, фосфорилируя (ингибируя) белок Bad, каспазу-9 [13] и каспазу-8 [15]. Активация PI3K, находящейся на пересечении сигнальных путей многих рецепторов, ведет к повышению активности MAP-киназ — ключевых регуляторов клеточного цикла.

Одно из важных свойств Wnt/β-катенин-сигнализации — участие в пролиферации клеток, что приводит к развитию новообразований. В результате активации Wnt-сигнализации накопленный β-катенин транслоцируется в ядро, где формирует активный транскрипционный комплекс с TCF/LEF (фактор Т-клеток/лимфоидный энхансерный фактор) [16]. Сигнальный путь Wnt негативно регулируется киназой 3 гликогенсинтазы (GSK3).  $Si^{2+}$  может увеличить экспрессию β-катенина и мембранного рецептора семейства Frizzled, а также ингибировать экспрессию Wnt-ингибиторов, предотвращая деградацию β-катенина [6]. Сигналы от лигандов Wnt могут передаваться с помощью RTK, что приводит к активации PLC и индукции соответствующего каскада событий. Не исключено взаимодействие между индуцированной стронцием активацией Wnt-пути и каскадом MAPK [5]. С одной стороны, сигнальный путь MAPK может регулировать канонический Wnt/β-катенин-зависимый путь в результате инактивации GSK3. С другой стороны, Wnt3a может активировать протеинкиназу p38 [6]. Показана способность стронция активировать Wnt-сигнальный путь при участии CaR [7].

Различные состояния вызывают характерные для каждого из них модификации как самого белка p53, так и систем, контролирующих его уровень и активность, что определяет поведение и судьбу измененной клетки, которая во многом зависит от тканевой принадлежности клеток. Белок p53 осуществляет одновременно и активацию гена *Bax*, и репрессию гена *Bcl-2* на уровне транскрипции [17], транскрипционно регулирует протеинфосфатазу PTEN (фосфатаза и гомолог тензина), негативного регулятора сигнального пути PI3K/Akt. Внутриклеточный белок p53 трансактивирует некоторые киллерные рецепторы, в

частности, Fas и KILLER/DR5 [17]. Действуя независимо от транскрипционной функции, p53 может вызывать апоптоз за счет прямого взаимодействия с белками BAX, Bcl-XL.

Детальное изучение апоптотической активности иммунцитов у детей в условиях повышенной экспозиции стронцием позволяет сделать вывод, что эффекты стронция зависят от дозы, времени воздействия, типа клетки и активационного статуса клетки [10]. Апоптоз запускается различными индуцирующими факторами, при этом используются различные сигнальные пути, которые, пересекаясь друг с другом, обеспечивают согласованный клеточный ответ. Таким образом, стронций при превышении его содержания в крови детей более чем в 2 раза по сравнению с референсными значениями, воздействует на различные пути регуляции апоптоза (CD95-, p53- и TNF-зависимый апоптоз), на сайты их интеграции, способствует снижению передачи апоптотического сигнала в иммунокомпетентных клетках и некротическому пути клеточной элиминации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zaytseva N.V., Dianova D.G., Dolgykh O.V. 2014. Effects of cellular immunity in conditions of surplus supply of strontium with consumed water. *EJNH*. **1**, 7–8.
2. Heitland P., Köster H.D. 2006. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **20** (4), 253–262.
3. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Лыхина Т.С., Кривцов А.В., Гугович А.М. 2012. Особенности лимфоцитарно-клеточного звена у детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях. *Биол. мембраны*. **29** (5), 349–353.
4. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. 2011. *Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно-методическое пособие для магистров по курсу “Теория апоптоза”*. Казань: ФГАОУ ВПО КФУ. 61 с.
5. Caverzasio J., Thouvery C. 2011. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth. *Cell. Physiol. Biochem.* **27** (3–4), 243–250.
6. Yang F., Yang D., Tu J., Zheng Q., Cai L., Wang L. 2011. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and *in vivo* bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.646.
7. Венгерский А.И., Хлусов И.А., Нечаев К.А. 2014. Молекулярные механизмы действия бисфосфонатов и стронция рanelата. *Эксп. клин. фармакол.* **77** (9), 43–46.
8. Huang C., Li L., Yu X., Gu Z., Zhang X. 2014. The inhibitory effect of strontium-doped calcium polyphosphate particles on cytokines from macrophages and osteoblasts leading to aseptic loosening *in vitro*. *Biomed. Mater.* **9** (2). doi: 10.1088/1748-6041/9/2/025010.
9. Hurtel-Lemaire A.S., Mentaverri R., Caudrillier A., Cournaire F., Wattel A., Kamel S., Terwilliger E.F.,

- Brown E.M., Brazier M. 2009. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **284**, 575–584.
10. Caudrillier A., Hurtel-Lemaire A.-S., Wattel A., Cournarie F., Godin C., Petit L., Petit J.-P., Terwilliger E., Kamel S., Brown E.M., Mentaverri R., Brazier M. 2010. Strontium ranelate decreases RANKL-induced osteoclastic differentiation *in vitro*: involvement of the calcium sensing receptor. *Mol. Pharmacol.* **4**, 569–576.
  11. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. 2003. Внутриклеточная сигнализация. Ред. Буданцев А.Ю. Пушкино: Электронное изд-во “Аналитическая микроскопия”. <http://www.booksite.ru/localtxt/zin/che/nko/zinchenko.pdf>.
  12. Fromigué O., Haÿ E., Barbara A. 2009. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *JCMM.* **13** (8B), 2189–2199.
  13. Los M., Maddika S., Erb B., SchulzeOsthoff K. 2009. Switching Akt: From survival signaling to deadly response. *BioEssays*, **31** (5), 492–495.
  14. Tucci P. 2012. Caloric restriction: is mammalian life extension linked to p53? *AGING.* **8**, 525–534.
  15. Yurchenko M., Shlapatska L.M., Sidorenko S.P. 2012. The multilevel regulation of CD95 signaling outcome. *Exp. oncol.* **34** (3), 200–2011.
  16. Li V.S., Ng S.S., Boersema P.J., Low T.Y., Karthaus W.R., Gerlach J.P., Mohammed S., Heck A.J., Maurice M.M., Mahmoudi T., Clevers H. 2012. Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact axin1 complex. *Cell.* **149**, 1245–1256.
  17. Копнин Б.П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия.* **1**, 5–33.

## Regulation by Strontium of Apoptotic Signal in Immunocytes

O. V. Dolgikh\*, N. V. Zaitseva, D. G. Dianova

*Federal Scientific Center of Medical and Preventive Health Risk Management Technologies,  
ul. Monastyrskaya 82, Perm, 614045 Russia;*

*\*e-mail: oleg@fcrisk.ru*

Exposure to heavy metals can initiate the development of negative effects in different organs and systems, including the immune system, and can appear as dysfunction of the receptor systems and the intracellular signaling. Participation of stable strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ ) in the regulation of the apoptotic signals in immunocompetent cells was analyzed. Various mechanisms, using which strontium modulates the apoptotic lymphocyte reaction, were described, and the formation of intracellular signal transduction involving  $\text{Sr}^{2+}$  was defined. Using the flow cytometry method, we studied changes in the membrane and intracellular markers of apoptosis in children who consumed drinking water with elevated levels of strontium. It was found that when the content of strontium in the blood was in the range of 0.0129–0.173 mg/dm<sup>3</sup>, it affected various ways of apoptosis regulation (CD95-, p53- and TNF-induced apoptosis) and their integration sites, thereby reducing transmission of the apoptotic signal in immunocompetent cells, and formed a cell elimination way alternative to apoptotic, which is based on the mechanism of necrosis.

**Keywords:** apoptotic signal, immunocompetent cell, strontium.