

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ СТАБИЛЬНОГО СТРОНЦИЯ НА КЛЕТОЧНУЮ ГИБЕЛЬ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

© 2018 г. А. А. Мазунина, Е. А. Мухачева, О. В. Долгих*

*E-mail: oleg@fcrisk.ru

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Приведены результаты эксперимента в системе *in vitro*, верифицирующие влияние стабильного стронция на реализацию клеточной гибели при его хроническом низкодозовом поступлении в организм с питьевой водой. В условиях эксперимента доказано, что стронций в концентрации 7 мг / дм³, соответствующей предельно допустимой концентрации для воды водных объектов, ингибирует апоптоз по критерию Annexin V-FITC⁺PI⁻ в 4,7 раза и стимулирует гибель лимфоцитов, по пути некроз (Annexin V-FITC⁺PI⁺) в 1,4 раза.

Ключевые слова: проточная цитометрия, апоптоз лимфоцитов, стронций

DOI: 10.31857/S102872210002641-0

Авторы:

Мазунина А. А., м. н. с. лаборатории иммуногенетики отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

Мухачева Е. А., фельдшер-лаборант лаборатории иммунологии и аллергологии отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

Долгих О. В., д. м. н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия.

Введение. Метод проточной цитометрии — это один из наиболее востребованных методов изучения клетки для решения научных и клинических задач в различных областях медицины и биотехнологии. Проточную цитометрию наиболее часто используют для исследования клеток крови и костного мозга, их антигенного состава, функциональной активности. Также возможно количественное и качественное исследование таких физиологических внутриклеточных параметров, как рН, уровень окислительных процессов, активация митохондрий, потенциал наружной мембраны клеток, процессы, связанные с апоптозом [1].

Апоптоз является одним из ключевых механизмов поддержания постоянства внутренней среды многоклеточного организма, и его оценка является необходимой составляющей фундаментальных и прикладных исследований в экс-

периментальной биологии и иммунологии [2]. По современным представлениям программированная гибель клетки результат баланса проапоптотических и антиапоптотических сигналов для клетки [3]. Преобладание проапоптотических или антиапоптотических влияний определяет выбор направления сигнализации в сторону гибели клетки по механизму апоптоза или ее выживания. Нарушение реализации клеточной гибели по механизму апоптоза (активация или ингибирование) может возникнуть в результате влияния различных повреждающих факторов, действующих в небольших дозах, например, щелочноземельных металлов (стронций), поступающих в организм с питьевой водой.

Цель работы — с использованием метода проточной цитометрии верифицировать в условиях эксперимента модифицирующее влияние стабильного стронция на клеточную гибель.

Материалы и методы. Кровь из локтевой вены получали утром натощак в вакуумные пробирки системы «Vacutaner» фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA), с антикоагулянтом К3EDTA у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции. Всего отобрано 49 проб крови. Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили методом, основанным на определении экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с FITC (Fluorescein Isothiocyanate) (Annexin V-FITC) («BD», USA). В качестве витального красителя использовали пропидиум йодид (PI (Propidium Iodide)) («BD», USA). Живые клетки негативны по Annexin V

и PI, Annexin V-FITC⁺PI⁻ – ранний апоптоз (обратимый), Annexin V-FITC⁺PI⁺ – поздний апоптоз (необратимый) и / или некроз [2]. Для изучения влияния стронция (Sr²⁺) на реализацию апоптоза опытные пробы инкубировали со стронцием в концентрации 7 мг/дм³ (соответствующей ПДК для воды водных объектов) в течение 4 часов при 37 °С. В качестве контроля использована суспензия клеток без добавления стронция, которые инкубировались при таких же условиях. В экспериментах со стронцием жизнеспособность клеток оценивали после инкубации в термостате при 37 °С, время инкубации подбирали опытным путем (1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов). Жизнеспособность клеток рассчитывается как количество жизнеспособных клеток, поделенное на общее число клеток в камере Горяева. Клетки, окрашенные трипановым синим, считаются нежизнеспособными. Этот краситель не проникает через мембраны живых клеток, но при их повреждении способен окрашивать клеточное ядро. Жизнеспособность клеток должна быть не менее 95% для здоровых культур.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы (*Me*) и значений 25-го и 75-го перцентилей ([25, 75]). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (*p*), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Экспериментально доказано, что в системе *in vitro*, стронций, в концентрации 7 мг/дм³, соответствующей ПДК для воды водных объектов, с высокой степенью достоверности (*p* < 0,05) ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели по пути некроза по критерию содержания фосфатидилсерина, выявляемого в тесте с аннексином.

После внесения в опытные образцы стронция в концентрации 7 мг/дм³ отмечается статистически значимое (*p* = 0,001) снижение в 4,68 раза количества Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клеток и статистически значимое (*p* = 0,021) повышение количества Annexin V-FITC⁺PI⁺ -клеток в 1,35 раза. Следует отметить, что во всех анализируемых пробах после внесения стронция

в суспензию лейкоцитов отмечается повышение процентного содержания Annexin V-FITC⁺PI⁻ -клеток от 10% до 50% от исходного уровня.

Стронций, будучи изоформен кальцию (Ca²⁺) и обладая высокой подвижностью, способен блокировать ионные каналы для последнего, воздействовать на кальций-зависимые рецепторы и конкурировать за активные участки белков, не выполняя физиологической функции, что формирует модифицирующее влияние стронция на иммунную реакцию [4]. На изменение концентрации кальция реагируют каналы, помпы, экспрессия генов, защитных молекул, NO и др. Стронций может заменить Ca²⁺ и стимулировать множество функций многочисленных типов клеток. Важнейшей функцией кальция является его участие во множестве сигнальных путей клетки. Sr²⁺ оказывает свое влияние посредством взаимодействия с кальций зависимым рецептором на клетке, однако, в дальнейшем, в отличие от ионов кальция, использует различные пути трансдукции внутриклеточных сигналов. Эта разница в соответствующих сигнальных каскадах позволяет Sr²⁺ усиливать кальций-индуцированный ответ клетки, и наоборот. Между тем, есть сообщения, что стронций оказывает пролиферативный и антиапоптозный эффект на клетки организма не используя Ca-зависимые рецепторы. В связи с тем, что кальций выполняет ключевую роль мессенджера, а также Ca²⁺ является важным регулятором многих жизненно важных метаболических и генетических процессов клетки, нарушение транспорта и внутриклеточного распределения этого иона играет важную роль в молекулярных механизмах развития многих патологических процессов, в основе которых может быть нарушение клеточной гибели по пути апоптоза и / или некроза. Очевидно, стронций, при поступлении в организм, заменяя кальций, может изменять внутриклеточную передачу апоптогенного сигнала, модифицируя реализацию клеточной гибели.

Выводы. Таким образом, верификация особенностей нарушений клеточной гибели в эксперименте позволила провести моделирование условий летальной программы лимфоцита и экспериментально доказать, что стронций *in vitro*, в концентрации 7 мг/дм³, не превышающей недействующую концентрацию его присутствия в окружающей среде, ингибирует апоптоз в 4,7 раза (по критерию Annexin V-FITC⁺PI⁻) и стимулирует гибель клетки по пути некроза

(по критерию Annexin V-FITC⁺PI⁺-лимфоцитов) в 1,4 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Битанова Э.Ж., Тарабаева А.С. Проточная цитометрия – преимущества метода и области применения. Вестник КазНМУ 2017, 4, 465–467. [Bitanova E. Zh., Tarabaeva A. S. Flow cytometry – the advantages of the method and field of application. Bulletin of KazNMU 2017, 4, 465–467].
2. Кудрявцев И. В., Головкин А. С., Зурочка А. В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии. Медицинская иммунология 2012, 6, 461–482. [Kudryavtsev I. V., Golovkin A. S., Zurochka A. V. Modern methods and approaches to the study of apoptosis in experimental biology. Medical. Immunology 2012, 6, 461–482].
3. Дианова Д. Г., Долгих О. В., Кривцов А. В. Особенности регуляции иммунной системы у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции. Гигиена и санитария. 2018, 1, 25–29. [Dianova D. G., Dolgikh O. V., Krivtsov A. V. Features of the regulation of the immune system in children living in the strontium geochemical province. Hygiene and Sanitation 2018, 1, 25–29].
4. Долгих О. И., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г. Регуляция стронцием апоптотического сигнала в иммуноцитах. Биологические мембраны 2016, 33(1), 1–5. [Dolgikh O. V., Zaitseva N. V., Dianova D. G. Strontium regulation of the apoptotic signal in immunocytes. Biological membranes 2016, 33 (1), 1–5].

MODIFYING EFFECT OF STABLE STRONTIUM ON CELL DEATH WITHIN THE CONDITIONS OF EXPERIMENT

© 2018 A. A. Mazunina, E. A. Mukhacheva, O. V. Dolgikh*

*E-mail: oleg@fcrisk.ru

FBSI «Federal scientific center for medical and preventive health risk management technologies», Perm, Russia

The experimental results, obtained from in vitro system, which are verifying the effect of stable strontium on cell death realization at chronic low-dose exposure of a body with drinking water, are demonstrated. The experiment has proved that strontium in concentration of 7 mg/dm³, that corresponds to maximum permissible concentration for water of water bodies, inhibits the apoptosis due to criteria Annexin V-FITC⁺PI⁻ by 4.7 times and induces death of lymphocytes of necrosis type (Annexin V-FITC⁺PI⁺) by 1.4 times.

Key words: flow cytometry, lymphocyte apoptosis, strontium

Authors:

Mazunina A. A., Junior Researcher of the Immunogenetics Laboratory of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of the FBSI «Federal scientific center for medical and preventive health risk management technologies», Perm, Russia;

Mukhacheva E. A., assistant laboratory of immunology and allergology of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of the FBSI «Federal scientific center for medical and preventive health risk management technologies», Perm, Russia

Dolgikh O. V., MD, Professor, Head of the Department of Immunobiological Methods of Diagnostics of the FBSI «Federal scientific center for medical and preventive health risk management technologies», Perm, Russia; **E-mail:** oleg@fcrisk.ru