

КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ В УСЛОВИЯХ ГАПТЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ БИОСРЕД НА ПРИМЕРЕ СТАБИЛЬНОГО СТРОНЦИЯ

© 2021 г. ¹О. В. Долгих, ^{1,2}Д. Г. Дианова, ¹А. В. Кривцов

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Пермь; ²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерство здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь, Россия

Введение: Условия гаптенной контаминации биосред стабильным стронцием нарушают реализацию программированной клеточной гибели, формируя ранние нарушения здоровья детей.

Цель: Исследование показателей, характеризующих клеточную гибель, у детей с избыточной гаптенной контаминацией биосред природным стабильным стронцием.

Методы: Выборочную совокупность составили дети, потребляющие питьевую воду из подземных источников питьевого водоснабжения с избыточным содержанием природного стронция, и дети, потребляющие питьевую воду удовлетворительного качества по содержанию стронция. Показатели, характеризующие клеточную гибель, изучались методом проточной цитометрии, полиморфизм кандидатных генов – методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты: Установлено, что у детей, экспонированных стронцием, статистически значимо ($p < 0,001$ для всех сравнений) снижено в среднем в 2,5 раза содержание p53, проапоптотической рецепции CD95⁺-лимфоцитов, Annexin V-FITC⁺PI⁻-лимфоцитов с одновременным повышением в среднем в 1,7 раза лимфоцитарных фенотипов CD25⁺-лимфоцитов и ассоциированных с некротической гибелью Annexin V-FITC⁺PI⁻-лимфоцитов. Наблюдается повышенная частотность гетерозиготного генотипа гена *MMP9 Gln279Arg* в 2,5 раза относительно результатов, полученных у неэкспонированных детей.

Вывод: Концентрации стронция в крови в диапазоне от 0,040 до 0,091 мг/дм³ ассоциированы с ингибированием апоптоза и переключением на альтернативный путь клеточной гибели – некроз, что на фоне полиморфности кандидатных генов создает опасность формирования аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: стабильный стронций, клеточная гибель, полиморфизм генов

CELL DEATH UNDER CONDITIONS OF HAPTIC CONTAMINATION OF BIOLOGICAL MEDIA BY STABLE STRONTIUM

¹O. V. Dolgikh, ^{1,2}D. G. Dianova, ¹A. V. Krivtsov

¹Federal Scientific Center for medical and preventive health risk management technologies
of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Perm;

²Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

Introduction: The conditions of haptic contamination with stable strontium disrupt the implementation of programmed cell death, forming early health disorders of the child population.

Aim: to study the indicators, characterizing cell death, in children with excess haptic contamination of biological media with natural stable strontium.

Methods: Research group: children consuming drinking water from underground drinking water sources with excess content of natural stable strontium, comparison group: children consuming drinking water of satisfactory quality in terms of strontium content. The study of indicators characterizing cell death was carried out by flow cytometry; polymorphism of candidate genes by real-time PCR.

Results: It was found that in children exposed to strontium, the content of protein-oncosuppressor p53, proapoptotic reception of CD95⁺- lymphocytes, Annexin V-FITC⁺PI⁻-lymphocytes with a simultaneous increase in an average of 1.7 times lymphocytic phenotypes of CD95⁺- lymphocytes and associated with necrotic death of Annexin V-FITC⁺PI⁻-lymphocytes are statistically significant ($p < 0.001$) decreased by an average of 2.5 times. An increased frequency of the heterozygous genotype of the matrix metalloproteinase gene *MMP9 Gln279Arg* is 2.5 times higher than the results obtained in unexposed children.

Conclusion: The results of the studies allowed us to establish that strontium concentrations in the blood in the range from 0.040 to 0.091 mg/dm³ are associated with inhibition of apoptosis and switching to an alternative pathway of cell death-necrosis, which, against the background of polymorphism of candidate genes, creates a risk of autoimmune pathology.

Key words: stable strontium, cell death, genes' polymorphism

Библиографическая ссылка:

Долгих О. В., Дианова Д. Г., Кривцов А. В. Клеточная гибель в условиях гаптогенной контаминации биосред на примере стабильного стронция // Экология человека. 2021. № 10. С. 21–28.

For citing:

Dolgikh O. V., Dianova D. G., Krivtsov A. V. Cell Death under Conditions of Haptic Contamination of Biological Media by Stable Strontium. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2021, 10, pp. 21-28.

Введение

Апоптоз является распространенной формой клеточной гибели, имеющей решающее значение для нормального развития и функционирования многоклеточных организмов [9]. Поскольку у здорового взрослого человека для поддержания постоянного числа клеток каждый день образуется приблизительно 10^{11} – 10^{12} клеток, то быстрая пролиферация должна компенсироваться апоптозом. Нарушения этого баланса в любом направлении имеет для организма негативные последствия, вызванные развитием патологических процессов. Аномально высокий уровень гибели клеток обнаруживается при СПИД и сердечно-сосудистых заболеваниях, нейродегенеративных заболеваниях, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона, между тем ингибирование апоптоза выявляется при онкологических заболеваниях [14]. Воздействия различных внешних и внутренних факторов способствуют дисрегуляции апоптоза. Показано, что неудовлетворительное качество среды обитания приводит к контаминации биосред (крови) химическими веществами, обуславливающей нарушения клеточной гибели. В частности, присутствующие в питьевой воде щелочно-земельные металлы (например, стабильный стронций, Sr^{2+}), являющиеся гаптенами, формируют особенности микрокомпонентного состава биосред, вследствие чего трансформируются апоптотические сигналы, изменяющие генетическую программу клетки [3, 4].

Нарушения клеточной гибели в условиях контаминантной нагрузки биосред, обусловленной воздействием химических факторов среды обитания, могут проявляться активацией апоптоза или, наоборот, ингибированием реализации данного процесса. При этом наиболее чувствительным к негативным воздействиям химического фактора является детский организм. Формирование иммунной системы организма происходит на протяжении всего периода детства и многими авторами рассматривается в качестве основной мишени токсического воздействия загрязняющих веществ. Вероятность нарушения клеточной гибели, ассоциированная с избыточной контаминацией биосред гаптенами, обусловили актуальность данного исследования.

Цель работы — исследование показателей, характеризующих клеточную гибель, у детей с избыточной гаптенной контаминацией биосред природным стабильным стронцием.

Методы

При планировании исследования выполнен расчет объема выборки, достаточной для проверки статистической значимости различий с учетом альфа-ошибки ($\alpha = 0,05$) и статистической мощности (80 %). Настоящее исследование выполнено с соблюдением этических требований Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Проведенные исследования одобрены этическим комитетом ФБУН

«ФНЦ МПТ УРЗН» Роспотребнадзора. Выполнено одномоментное поперечное исследование. Проведено углубленное обследование 101 ребенка дошкольного возраста, мальчиков — 40 (40 %), девочек — 61 (60 %), проживающих на территориях с различным содержанием стабильного стронция в питьевой воде (Sr^{2+}). Группу сравнения составил 51 ребенок, потребляющие питьевую воду удовлетворительного качества по содержанию стронция, группу наблюдения — 50 детей, потребляющие питьевую воду из подземных источников питьевого водоснабжения с избыточным содержанием природного стабильного стронция. Критерии включения в исследование: дети от 4 до 8 лет со второй группой здоровья, принадлежность к европеоидной расе, отсутствие приема иммунокорректоров и глюкокортикостероидов последние шесть месяцев, отсутствие в анамнезе иммунозависимой патологии, врожденной патологии, согласие родителей (опекунов) на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие заболеваний в стадии декомпенсации (органические и инфекционные поражения центральной нервной системы, заболевания сердечно-сосудистой системы, бронхолегочной и мочеполовой систем, заболевания желудочно-кишечного тракта), участие обследуемых детей в другом исследовании. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных. По социально-бытовым критериям дети группы наблюдения и группы сравнения были сопоставимы и соответствовали среднему уровню материальной обеспеченности, жилищные условия отвечали гигиеническим требованиям.

Анализ содержания металлов в биосредах детей (кровь) выполнен с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе Agilent 7500_{cx} (Agilent Technologies Inc., USA). Определение мембранных и внутриклеточных маркеров клеточной гибели выполняли с помощью проточного цитометра FACSCalibur фирмы Becton Dickinson («BD», USA). Определение уровня экспрессии мембранных CD-рецепторов CD95⁺ (FAS), CD25⁺ на лимфоцитах проводили методом мембранной иммуофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). Определение внутриклеточного маркера апоптоза — р53-протеина — проводилось с помощью МКАТ против белка р53, конъюгированных с PE (Phycoerythrin) Becton Coulter («BC», USA) согласно протоколу фирмы-производителя. Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC (Annexin V-FITC) и пропидиум йодидом (PI (Propidium Iodide)) («BD», USA) Annexin V-FITC⁺PI⁻ — ранний апоптоз, Annexin V-FITC⁺PI⁺ — поздний апоптоз и/или некроз. Забор материала для полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводился методом взятия мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Затем выделяли ДНК с помощью сорбентного метода, в основе которого лежит разрушение клеток с дальнейшей сорбцией

нуклеиновых кислот на сорбент. Для исследования полиморфных вариантов в изучаемых генах использовали методику ПЦР, в основе которой лежит реакция амплификации и детекция продуктов этой реакции в режиме реального времени (мультиплексная ПЦР). В качестве праймеров использовали участки ДНК генов: *CPOX rs1131857*; *CYP1A1 Ile462Val*; *MMP9 Gln279Arg*; *TP53 rs178841594*; *MTHFR rs1801131*. Для определения генотипа человека использовали метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров.

Экспериментальные модели in vitro. Для изучения воздействия стронция на клеточную гибель использовали суспензию лимфоцитов, полученную от экспонированных детей. В экспериментах с анализируемым гаптенем 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. Для изучения влияния Sr²⁺ на реализацию апоптоза опытные пробы инкубировали со стронцием в концентрации 0,07 мг/дм³ (соответствующей референтной концентрации для крови) в течение 4 часов при 37 °С. В качестве контроля использована суспензия клеток без добавления стронция, которые инкубировались при таких же условиях.

Статобработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт», служащей для расчета статистических параметров для исследований «случай – контроль», использующих SNP. Проверка распределения количественных данных проводилась с помощью статистического критерия Колмогорова – Смирнова. Для описания данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (SD) и 95 % доверительного интервала для среднего (95 % ДИ). Данные с распределением, отличающимся от нормального, описаны с помощью медианы (Me), 25-го и 75-го процентилей (P₂₅; P₇₅) и 95 % доверительного интервала для медианы (95 % ДИ). Для проверки нулевых гипотез о равенстве средних значений между двумя независимыми группами применялся критерий Манна – Уитни. Сравнение выборочных данных с референтными уровнями выполнено с использованием одновыборочного критерия Вилкоксона. Уровень значимости, на котором проводилась проверка нулевых гипотез, принимался равным 0,05. Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты

В биосредах детей, потребляющих питьевую воду с повышенным содержанием стронция, данный щелочно-земельный металл идентифицирован в диапазоне от 0,040 до 0,091 мг/дм³ (табл. 1). Максимальное значение Sr²⁺ в крови детей, проживающих на территории стронциевой геохимической провинции, статистически значимо (p = 0,020) в 1,2 раза превышает верхнюю границу диапазона референтного интервала стронция в крови. Доля проб с избыточным содержанием стронция в крови относительно референтных значений в крови детей группы наблюдения составила 50 %. Установлено, что у детей, экспонированных стронцием, в биологических средах статистически значимо (p = 0,020) в 2,2 раза повышено среднегрупповое содержание стронция по сравнению со значениями, полученными у неэкспонированных детей. У детей группы сравнения стронций в крови идентифицирован в диапазоне от 0,002 до 0,040 мг/дм³ и находится пределах референтного интервала.

Таблица 1
Сравнительная оценка содержания стабильного стронция в крови детей

Показатель	Группа сравнения (n = 51)	Группа наблюдения (n = 50)
M	0,027*	0,058
SD	0,0047	0,0114
95 % для M	0,017–0,036	0,036–0,080
Min – Max	0,002–0,040	0,040–0,091**

Примечания: * – p = 0,020; ** – p = 0,020; референтные значения = 0,010–0,077 [13].

У детей при гаптенной контаминации биосред статистически значимо (p < 0,001) в среднем в 1,8 раза повышена экспрессия (долевое содержание и абсолютное число) маркёра ранней активации CD25⁺ на Т-клетках относительно контрольного диапазона значений. Обнаружено, что у детей группы наблюдения статистически значимо (p < 0,001) в 3,8 раза снижена экспрессия белка p53 по сравнению с результатами, полученными у детей группы сравнения (табл. 2). Изучение мембранных маркёров апоптоза выявило у экспонированных детей статистически значимое (p < 0,001) в 1,5 раза повышение долевого содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD95⁺-рецептор, относительно контрольного диапазона. Оценка результатов иммунологического обследования показала, что у детей с повышенным содержанием в крови стабильного стронция, статистически значимо (p < 0,001) в 2,2 раза снижено количество Annexin V-FITC⁺PI⁻ клеток по сравнению с результатами, полученными у детей, в биосредах которых стронций идентифицирован в пределах референтных значений. Обнаружено, что у детей группы наблюдения статистически значимо (p < 0,001) в 1,5 раза увеличено содержание Annexin V-FITC⁺PI⁺ клеток по отношению к значениям, полученным у детей группы сравнения.

Таблица 2

Изменение показателей клеточной гибели в зависимости от уровня контаминации крови стронцием у обследуемых детей

Показатель	Группа сравнения (n = 51)		Группа наблюдения (n = 50)		P
	Me (P ₂₅ ; P ₇₅)	95 % ДИ	Me (P ₂₅ ; P ₇₅)	95 % ДИ	
CD25 ⁺ , %	6,00 (5,00; 7,00)	5,68–6,89	12,00 (6,50; 19,50)	10,31–17,35	<0,001
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,15 (0,12; 0,18)	0,13–0,17	0,25 (0,20; 0,48)	0,24–0,44	<0,001
CD95 ⁺ , %	26,00 (21,00; 33,00)	25,03–29,22	17,50 (13,50; 23,50)	15,48–22,92	<0,001
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,63 (0,52; 0,76)	0,60–0,73	0,43 (0,33; 0,55)	0,37–0,60	<0,001
p53, %	2,03 (1,57; 3,31)	1,75–3,67	0,53 (0,28; 0,88)	0,22–0,98	<0,001
Annexin V-FITC+PI ⁺ , %	1,49 (1,22; 1,78)	1,34–1,78	0,67 (0,47; 0,97)	0,55–0,88	<0,001
Annexin V-FITC+PI ⁺ , %	6,97 (5,55; 9,82)	6,64–8,86	10,57 (8,68; 14,72)	9,53–16,10	<0,001

Установлены негативные ассоциации полиморфизма гена *MMP9 Gln279Arg*, характеризующиеся статистически значимой избыточной распространенностью гетерозиготного варианта в 2,5 раза, что указывает на наличие негативной генетической вариабельности с предрасположенностью к онкологическим и аутоиммунным заболеваниям (табл. 3). Статистический анализ SNP-различий гена *MMP9 Gln279Arg* между группами наблюдения и сравнения позволил установить соответствие показателей «случаи» и «контроли» равновесию Харди – Вайнберга, которое характеризуется отсутствием значимых различий между имеющейся и ожидаемой частотами генотипов генов, что в дальнейшем позволяет оценить вклад

Таблица 3

Особенности генетического полиморфизма у детей, потребляющих воду с повышенным содержанием стронция

Ген	Генотип	Группа сравнения (n = 51)		Группа наблюдения (n = 50)	
		Абс.	%	Абс.	%
<i>MTHFR rs1801131</i>	GG	18	35	21	41
	GA	27	53	20	41
	AA	6	12	9	18
	G	62	62	62	62
	A	40	38	38	38
<i>CPOX rs1131857</i>	AA	37	74	36	71
	CA	10	19	13	26
	CC	4	7	1	3
	A	86	84	84	84
	C	16	16	16	16
<i>CYP1A1 Ile462Val</i>	GG	42	84	45	89
	GA	8	14	5	11
	AA	1	2	0	0
	G	92	91	94	94
	A	10	9	6	6
<i>MMP9 Gln279Arg</i>	AA	28	56	15	30
	GA	16	32	33	66
	GG	7	12	2	4
	A	72	72	64	64
	G	30	28	36	36
<i>TP53 rs17884159</i>	CC	20	39	20	41
	TC	25	49	25	50
	TT	6	12	5	9
	C	64	64	66	66
	T	38	36	34	34

аллелей этого гена в развитие негативных последствий с применением различных моделей наследования. В нашем случае различие генотипов *MMP9 Gln279Arg* между выборками статистически значимо описывается как общей ($\chi^2 = 12,6$; $p = 0,002$), так и аддитивной ($\chi^2 = 4,67$; $p = 0,031$) моделями (табл. 4, 5).

Таблица 4

SNP-различия гена *MMP9 Gln279Arg* между группами наблюдения и сравнения (общая модель наследования – тест χ^2 , df = 1)

Аллель	Случай	Контроль	OR	
			Значение	95 % ДИ
Генотип A/A	0,300	0,549	0,35	0,16–0,80
Генотип A/G	0,660	0,314	4,25*	1,85–9,76
Генотип G/G	0,040	0,137	0,26	0,05–1,33

Примечания: * – $\chi^2 = 12,6$; $p = 0,002$.

Таблица 5

SNP-различия гена *MMP9 Gln279Arg* между группами наблюдения и сравнения (аддитивная модель наследования – тест Кохрана – Армитаджа для линейных трендов, $\chi^2 = [0, 1, 2]$, df = 1)

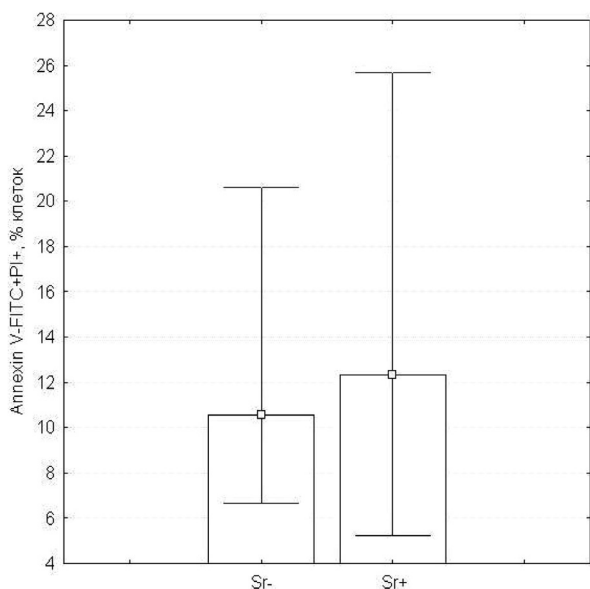
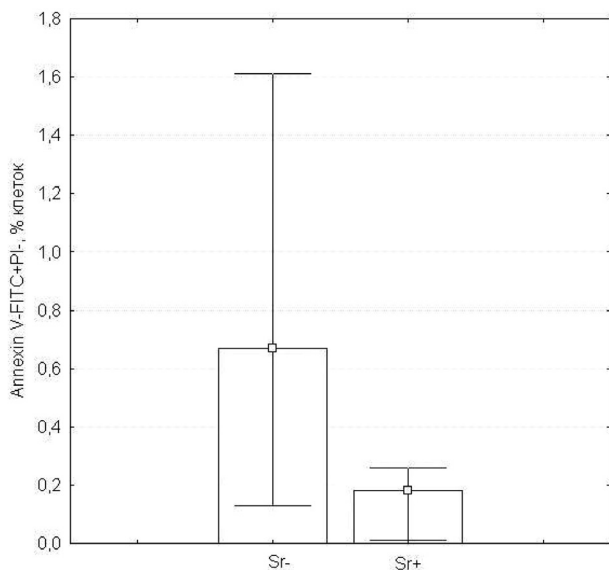
Генотип	Случай	Контроль	OR	
			Значение	95 % ДИ
Генотип A/A	0,300	0,549	0,35	0,16–0,8
Генотип A/G	0,660	0,314	4,25*	1,85–9,76
Генотип G/G	0,040	0,137	0,26	0,05–1,33

Примечания: * $\chi^2 = 4,67$; $p = 0,031$.

В системе *in vitro* установлено, что стронций в концентрации 7 мг/дм³ ингибирует гибель клетки по пути апоптоза (рисунок). После внесения в опытные образцы стронция обнаружено статистически значимое (Me 0,18; 95% ДИ 0,11–0,29; U = 37,50; Z = 4,80; $p < 0,001$) снижение в 2,2 раза количества Annexin V-FITC+PI⁺-клеток. Количество лимфоцитов, погибших по пути некроза после инкубации со Sr²⁺, увеличилось в 1,3 раза от исходного уровня (Me 13,33; 95 % ДИ 10,87–17,05; U = 207,00; Z = -0,82; $p = 0,411$).

Обсуждение результатов

Очевидно, что в условиях гаптенной контаминации биосред стронцием происходит ингибирование апоптоза и активация клеточной гибели по пути некроза.



Результаты эксперимента в системе *in vitro* (Me, размах без выброса); Sr- — проба без добавления стронция (контрольная); Sr+ — проба с добавлением стронция (опытная)

По результатам ранее выполненных исследований доказано, что в среднем 57 % (максимум до 97 %) стронция из питьевой воды попадает в организм [12]. Факторами, изменяющими чувствительность организма к воздействию стронция, являются возраст, физическое состояние, генетический статус, питание, наличие вредных привычек (курение) [20]. Между тем не установлены гендерные особенности скорости поглощения стронция в желудочно-кишечном тракте. Дети, в отличие от взрослых, особенно в первые месяцы и годы жизни подвержены негативному влиянию стронция на организм. После рождения продолжают рост и дифференциация костной ткани, формирование скелета, что диктует необходимость значительного поступления кальция

в организм. Как результат повышенной потребности организма в кальции в период роста костей происходит большее поглощение, всасывание из желудочно-кишечного тракта и удержание стронция в организме [12, 20].

Основным механизмом потенциальной иммуносупрессивности стронция является его прямая конкуренция с кальцием (Ca^{2+}), имеющим в атоме на одну электронную оболочку меньше по сравнению со стронцием. Формируется конкуренция между Sr^{2+} и Ca^{2+} за связывания с различными кальцийсвязывающими белками, вторичными клеточными мессенджерами и чувствительными к кальцию рецепторами, сопряженными с G-белками, экспрессируемыми в клетках костной ткани, иммунной системы и других клетках организма [12]. Стронций способен замещать Ca^{2+} , а последнему принадлежит ключевая роль в регуляции важнейших внутриклеточных сигнальных каскадов. В регуляции кальциевого гомеостаза клеток, в том числе и лимфоцитов, участвуют митохондрии. Установлена способность стронция опосредованно модифицировать транскрипцию ряда генов, контролирующих апоптоз.

Экспериментально продемонстрирована стронцийиндуцированная активация канонического сигнального пути Wnt/ β -катенин инициирующего транскрипцию генов, регулирующих клеточный цикл [23]. Некоторые исследования показали Sr-опосредованную активацию неканонического Wnt-сигнального пути, отвечающего за организацию цитоскелета и кальциевый обмен [16]. Установлено, что стронций активирует сигнальный путь SDF-1 α /CXCR4 как в системе *in vitro*, так и в системе *in vivo* [24]. CXCR4 реализует активацию Ras (протоонкогена) и ZAP-70 — молекулу, активирующую T-лимфоциты. Экспрессия SDF-1 возникает при стрессовых ситуациях (гипоксия, механическая травма и др.), его роль заключается в ингибировании апоптоза и стимуляции пролиферации клеток. SDF-1 α активирует сигнальный путь PI3K/Akt [15], ключевой функцией которого является регуляция (торможение) апоптоза [19]. Между тем ингибирование сигнального каскада PI3K/Akt ограничивает активацию T-лимфоцитов [22]. FGF/FGFR — система, запускаемая стронцием, активирует Akt-, ERK1,3-, p38-опосредованный сигналинг, обеспечивающий регуляцию апоптоза [8]. Антиапоптотический фактор Akt способен регулировать уровни Ca^{2+} в митохондриях посредством уменьшения потока кальция из эндоплазматического ретикула. Данный эффект возможен в результате ингибирования инотропного IP3R. По данному механизму Akt защищает клетку от апоптоза, опосредованного Ca^{2+} . Интересно, что Akt может локализоваться также в митохондриях, а внутримитохондриальная активная Akt обеспечивает эффективную защиту от апоптотической передачи сигналов [11]. Посредством Akt-зависимого фосфорилирования ряда белков изменяется уровень экспрессии p53 [21]. В опухолевых клетках Akt/

PKB и PI3K стимулируют метаболизм глюкозы, в результате чего увеличивают выживаемость и рост патологических клеток. Активация Akt/PKB повышает содержание поверхностных глюкозных транспортеров и координирует положение и экспрессию митохондриальных гексокиназ, отвечающих за фосфорилирование глюкозы [5]. PI3-киназный и MAP-киназный каскады являются ключевыми регуляторами деления многих клеток. Предполагают наличие негативной регуляции между p53-опосредованными путями и MAP-киназными путями [2]. Протеин p53 способен регулировать транскрипцию генов, белковые продукты которых изменяют механизм апоптоза: повышает транскрипцию респонсивных генов bax, p53, FAS, снижает транскрипцию — bcl-2. Показано, что протеинкиназные каскады в различных клеточных культурах способны ингибировать FAS-зависимый апоптоз на уровне активации каспазы-8 [2, 4]. В системе *in vivo* показано, что у крыс с моделированной интоксикацией стронцием (из расчета 2 г/л; ±200 мг/кг/день) наблюдается ингибирование апоптоза хондроцитов [10].

Показано, что генетические особенности, выраженность которых может быть достаточно значимой, характеризуются исключительно высокой чувствительностью к каким-либо химическим факторам, что повышает генетическую вариативность в популяции. Металлопротеиназы являются триггерами MAP-киназного пути, окислительного стресса, каспазазависимой гибели клетки. MMP гидролизуют FASL, цитокины, различные хемокины, в том числе SDF-1, способствуя активации или инактивации соответствующих субстратов. IL-2R α также является неколлагеновым субстратом MMP9 [7]. Митохондриальная MMP9 изменяет гомеостаз Ca²⁺ и увеличивает образование митохондриальных пор, что приводит к сократительной дисфункции в гипергомоцистеинемических кардиомиоцитах [17]. Данный эффект указывает на возможную роль MMP9 в нарушении активности Ca²⁺-АТФ-азы саркоплазматического ретикулума, подтверждая важнейшую роль MMP9 в гомеостазе кальция [18]. Гену *MTHFR* принадлежит ключевая роль в процессе метилирования и синтеза ДНК, показана его принадлежность к процессу репарации ДНК и накоплению повреждений хромосом, вследствие чего данный ген потенциально способен повышать риск развития рака [1]. Полиморфизм гена *MTHFR* рассматривается как важный фактор, влияющий на основные клеточные и митохондриальные дисфункции. Фермент *CYP1A1* локализован в легких, печени (менее 1 %), лимфоцитах, плаценте [6]. Ген цитохрома P-450 *CYP1A1* отвечает за метаболизм в первой фазе детоксикации. Риск развития патологии или генотоксических эффектов наибольший при высокой активности первой фазы и низкой активности второй фазы биотрансформации ксенобиотиков. Установлена ассоциация полиморфных генов фермента *CYP1A1* с нарушением состояния здоровья: предрасположенность к злокачественным новооб-

разованиям (рак легких, полости рта, лейкозы и др.) [6]. CPOX представляет собой митохондриальный фермент, кодируемый геном *CPOX*, активность которого реализуется при наличии молекулярного кислорода. Гены *MMP9 Gln279Arg*, *CYP1A1 Ile462Val*, *CPOX rs1131857*, *MTHFR rs1801131* модифицируют различные аспекты иммунного ответа: участвуют в модулировании апоптотических сигналов, определяют работу митохондрий, регулируют кальциевый обмен. Полиморфизм гена *TP53* ингибирует апоптоз и способствует развитию в клетках дополнительных онкогенных событий.

Очевидно, апоптоз инициируется множеством факторов и регулируется различными внутриклеточными сигнальными путями, пересекающимися между собой. Ответ клетки на воздействие Sr²⁺ будет зависеть от дозы вещества, времени воздействия, типа клетки, активационного статуса клетки, но наблюдаемый эффект всегда в той или иной степени будет касаться коррекции программы клеточной гибели.

Заключение

Таким образом, в условиях гаптенной контаминации биологических сред (кровь), обусловленной поступлением стабильного стронция с питьевой водой, происходит нарушение реализации запрограммированной клеточной гибели. Установлено, что у детей, экспонированных стронцием, статистически значимо ($p < 0,001$) снижено в среднем в 2,5 раза содержание белка p53, CD95⁺-лимфоцитов, Annexin V-FITC+PI⁻-лимфоцитов и повышено в среднем в 1,7 раза содержание CD25⁺-лимфоцитов и Annexin V-FITC+PI⁺-лимфоцитов, а также повышена частота гетерозиготного генотипа гена *MMP9 Gln279Arg* в 2,5 раза относительно результатов, полученных у неэкспонированных детей. Концентрация стронция в крови в диапазоне от 0,040 до 0,091 мг/дм³ ассоциирована с ингибированием апоптоза и переключением на альтернативный путь клеточной гибели — некроз, что на фоне полиморфности кандидатных генов создает опасность формирования аутоиммунной патологии.

Авторство

Долгих О. В. внес существенный вклад в концепцию исследования и интерпретацию данных, окончательно утвердил присланную в редакцию рукопись; Дианова Д. Г. внесла существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ и интерпретацию данных, подготовила первый вариант статьи; Кривцов А. В. выполнил статистический анализ полученных результатов, внес существенный вклад в анализ данных.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Долгих Олег Владимирович — ORCID 0000-0003-4860-3145; SPIN 8288-7995

Дианова Дина Гумаровна — ORCID 0000-0002-0170-1824; SPIN 6494-1717

Кривцов Александр Владимирович — ORCID 0000-0001-7986-0326; SPIN 4835-7072

Список литературы / References

1. Баканова М. Л., Минина В. И., Савченко Я. А., Глушков А. Н. Полиморфные варианты генов фолатного цикла у больных раком легкого // Сибирский онкологический журнал. 2019. № 18 (2). С. 70–77.

Vakanova M. L., Minina V. I., Savchenko Ya. A., Glushkov A. N. Polymorphism of folate metabolism genes and risk of lung cancer. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal* [Siberian Journal of Oncology]. 2019, 18 (2), pp. 70-77. [In Russian]

2. Дерябин П. И., Бородкина А. В., Никольский Н. Н., Бурова Е. Б. Взаимосвязь p53/p21 и MAP-киназных путей в процессе преждевременного старения эндометриальных стволовых клеток человека // Цитология. 2015. Т. 57, № 11. С. 788–795.

Deryabin P. I., Borodkina A. V., Nikol'skii N. N., Burova E. B. The relationship between p53/p21/rb and mapk signaling pathways in human endometrium-derived stem cells under oxidative stress. *Tsitologiya*. 2015, 57 (11), pp. 788-795. [In Russian]

3. Дианова Д. Г., Долгих О. В., Кривцов А. В., Синицына О. О., Отавина Е. А. Особенности регуляции иммунной системы у детей, проживающих в условиях стронциевой геохимической провинции // Гигиена и санитария. 2018. Т. 97, № 1. С. 25–29.

Dianova D. G., Dolgikh O. V., Krivtsov A. V., Sinitsyna O. O., Otavina E. A. Peculiarities of the regulation of the immune system in children residing in conditions of strontium geochemical province. *Gigiena i Sanitariya*. 2018, 97, (1), pp. 25-29. [In Russian]

4. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г. Регуляция стронцием апоптотического сигнала в иммунocyтах // Биологические мембраны. 2016. № 1 (33). С. 1–5.

Dolgikh O. V., Zaitseva N. V., Dianova D. G. Regulation by Strontium of Apoptotic Signal in Immunocytes. *Biologicheskie membrany* [Biological membranes]. 2016, 1 (33), pp. 1-5. [In Russian]

5. Зубова С. Г., Шитикова Ж. В., Поспелова Т. В. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке // Цитология. 2012. № 8. С. 589–601.

Zubova S. G., Shitikova Zh. V., Pospelova T. V. TOR-Centric Concept of Regulation Mitogenic, Metabolic and Energetic Signal Processing in Cell. *Tsitologiya*. 2012, 8, pp. 589-601. [In Russian]

6. Рембовский В. Р., Могилenkova Л. А. Процессы детоксикации при воздействии химических веществ на организм. СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2017. 384 с.

Rembovskii V. R., Mogilenkova L. A. *Protsessy detoksikatsii pri vozdeistvii khimicheskikh veshchestv na organizm* [Detoxification processes when chemicals affect the body]. Saint Petersburg, 2017, 384 p.

7. Шадрина А. С., Плиева Я. З., Кушлинский Д. С., Морозов А. А., Чанг В. Л., Кушлинский Н. Е. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и патологии // Альманах клинической медицины. 2017. № 45 (4). С. 266–279.

Shadrina A. S., Plieva Ya. Z., Kushlinskii D. S., Morozov A. A., Chang V. L., Kushlinskii N. E. Classification, Regulation of Activity, and Genetic Polymorphism of Matrix Metalloproteinases in Health and Disease. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* [Almanac of Clinical Medicine]. 2017, 45 (4), pp. 266-279. [In Russian]

8. Caverzasio J., Thouverey C. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth. *Cellular Physiol. and Biochem*. 2011, 27 (3-4), pp. 243-250.

9. D'Arcy M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int*. 2019, 43 (6), pp. 582-592.

10. Fischer D. C., Jensen C., Rahn A., Salewski B., Kundt G., D'Haese P. C., Haffner D., Behets G. J. Moderate strontium loading induces rickets in rats with mild chronic renal failure. *Kidney Blood Press. Res*. 2011, 34 (6), pp. 375-381.

11. Giorgi C., Baldassari F., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missioli S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J. M., Wieckowski M. R., Pintona P. Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell Calcium*. 2012, 52 (1), pp. 36-43.

12. Guidelines for Canadian drinking water quality: guideline technical document-strontium. Water and air quality bureau, healthy environments and consumer safety branch, health Canada, Ottawa, Ontario. Health Canada, 2019, 58 p.

13. Heitland P., Köster H. D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2006, 20 (4), pp. 253-262.

14. Jan R., Chaudhry G. E. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv. Pharm. Bull*. 2019, 9 (2), pp. 205-218.

15. Liu Y., Liang H. M., Lv Y. Q., Tang S. M., Cheng P. Blockade of SDF-1/CXCR4 reduces adhesion-mediated chemoresistance of multiple myeloma cells via interacting with interleukin-6. *J. Cell. Physiol*. 2019, 234 (11), pp. 19702-19714.

16. Lu X., Zhang W., Liu Z., Ma S., Sun Y., Wu X., Zhang X., Gao P. Application of a strontium-loaded, phase-transited lysozyme coating to a titanium surface to enhance osteogenesis and osteoimmunomodulation. *Med. Sci. Monit*. 2019, 25, pp. 2658-2671.

17. Moshal K. S., Rodriguez W. E., Sen U., Tyagi S. C. Targeted deletion of MMP-9 attenuates myocardial contractile dysfunction in heart failure. *Physiol. Res*. 2008, 57, pp. 379-384.

18. Prathipati P., Metreweli N., Nandi S. S., Tust S. K., Mishra P. K. Ablation of matrix metalloproteinase-9 prevents contractile dysfunction of cardiomyocytes in diabetics. *Front. Physiol*. 2016, 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014091> (accessed: 16.11.2019).

19. Tian Z., Tang C., Wang Z. Neuroprotective effect of a ginkgetin at experimental ischemia / reperfusion of a brain by means of inhibition of apoptosis and activation of a signal way of PI3K/Akt/mTOR. *J. Cell. Biochem*. 2019, 18, pp. 11196-11210.

20. Toxicological profile for strontium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, public health service. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR), 2004. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp159.pdf> (accessed: 23.12.2017).

21. Tucci P. Caloric restriction: is mammalian life extension linked to p53? *AGING*. 2012, 8, pp. 525-534.

22. Uche U. U., Piccirillo A. R., Kataoka S., Grebinoski S. J., D'Cruz L. M., Kane L. P. PIK3IP1/TrIP restricts activation of T cells through inhibition of PI3K/Akt. *JEM*. 2018, 215 (12), pp. 3165-3179.

23. Yang F., Yang D., Tu J., Zheng Q., Tsai L.,

Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. *Stem. Cells.* 2011, 29 (6), pp. 981-991.

24. Zhou C., Xu A.-T., Wang D.-D., Lin G.-F., Liu T., He F.-M. The effects of Sr-incorporated micro/nano rough titanium surface on rBMSC migration and osteogenic differentiation for rapid osteointegration. *Biomater. Sci.* 2018, 6, pp. 1946-1961.

Контактная информация:

Долгих Олег Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»

Адрес: 614045, Пермский край, г. Пермь, ул. Монастырская, д. 82

E-mail: oleg@fcrisk.ru