—— СРАВНИТЕЛЬНАЯ И ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ ——

УДК 57.017

АКТИВАЦИЯ Fas РЕЦЕПТОРОВ, КАСПАЗЫ-8 И КАСПАЗЫ-3 ИОНАМИ ФТОРА В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫСЫ *IN VITRO*

© 2019 г. Н. И. Агалакова^{1,*}, Т. И. Петрова¹, Г. П. Гусев¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия *e-mail: nagalak@mail.ru

Поступила в редакцию 21.05.2018 г. После доработки 20.07.2018 г. Принята к публикации 13.08.2018 г.

Целью исследования было показать способность ионов фтора (F) активировать ключевые компоненты рецептор-зависимого пути апоптоза – мембранные рецепторы Fas, каспазы-8 и каспазы-3 – в эритроцитах крысы *in vitro*. Клетки инкубировали в присутствии увеличивающихся концентраций NaF (0.1–10 мM) в течение 1, 5 и 24 ч. Активность каспазы-8 и каспазы-3 оценивали с помощью проточной цитометрии, экспрессию Fas рецепторов – методом иммуноблоттинга. Результаты работы показали, что кинетика стимуляции Fas рецепторов, каспаз-8 и каспаз-3 в эритроцитах крысы ионами фтора различается и зависит как от его дозы, так и от времени экспозиции. Так, активация каспаз наблюдалась уже после 1 ч инкубации клеток с фтором, а обработка эритроцитов 5 мM NaF в течение суток увеличивала популяцию эритроцитов с активными каспазами-8 и каспазами-3 до ~15–16%. Однако экспрессия Fas рецепторов дозо-зависимо увеличивалась только после 24-ч инкубации с NaF. Таким образом, одним из механизмов, лежащих в основе преждевременной гибели эритроцитов крысы под действием фтора *in vitro*, является его способность стимулировать посредники рецептор-зависимого пути апоптоза, но возможно, что активация каспазы-8 и каспазы-3 происходит, по крайней мере частично, независимо от мембранного механизма активации Fas рецепторов.

Ключевые слова: эритроцит, крыса, каспаза, ионы фтора, Fas-рецепторы **DOI:** 10.1134/S0044452919020013

введение

В течение долгого времени фтор считался одним из микроэлементов, необходимых для нормального развития человека. Соединения фтора используются для профилактики заболеваний зубов и для лечения остеопороза благодаря его способности ингибировать потребление глюкозы микрофлорой полости рта и стимулировать рекальцификацию костной ткани. Во многих странах соединения фтора добавляются в питьевую воду, молоко, соль, пищевые добавки [1]. Однако в последнее время широкое применение фтора, особенно фторирование питьевой воды, вызывает бурные научные дебаты и массовые протесты населения [2, 3]. Никаких заболеваний при дефиците фтора не описано, а достоверных доказательств о его биохимической роли в организме нет. Наоборот, негативные эффекты фтора на здоровье человека известны с первой половины XX века, когда клинические обследования населения в регионах с его высоким содержанием в окружающей среде выявили трудно поддающееся лечению заболевание - эндемический флюороз, характеризующийся патологическими изменениями костной и зубной тканей, а также увеличением риска развития диабета, неврологических и эндокринных расстройств [3–7]. Кроме того, в последнее время из-за неконтролируемого потребления фторированной воды и фторсодержащих продуктов, часто превышающего терапевтический эффект, все больше случаев флюороза регистрируется в странах, где содержание фтора в окружающей среде низко.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе фтор-индуцированных токсических эффектов, разнообразны по природе и включают снижение внутриклеточной концентрации АТФ, окислительный стресс, изменение экспрессии генов и ингибирование синтеза белка, нарушение клеточного цикла, роста и дифференциации клеток, повреждение ДНК [8, 9]. Накапливающиеся повреждения приводят к гибели клеток, в том числе к апоптозу — регулируемому процессу программируемой клеточной гибели [10].

Апоптотические процессы реализуются через два основных пути передачи сигнала — рецепторзависимый сигнальный (внешний) путь с участием рецепторов гибели клетки и митохондриальный (собственный) путь. В зрелых эритроцитах млекопитающих, лишенных ядер и митохондрий, может быть активирован только рецептор-зависимый путь апоптоза. В ответ на апоптотические стимулы трансмембранные рецепторы клеточной гибели взаимодействуют с их специфическими внеклеточными лигандами, что приводит к формированию сигнального комплекса DISC (Death Inducing Signalling Complex), включающего адаптерный белок FADD и инициаторную каспазу-8. Активация каспазы-8 из этого комплекса инициирует каскад каспаз, приводящий к стимуляции эффекторной каспазы-3 и последующему протеолизу клеточных белков. В эритроцитах человека были идентифицированы рецепторы гибели Fas и неактивные зимогены каспаз-8 и каспаз-3 [11-15], а активные каспазы-8 и каспазы-3 были выявлены в старых эритроцитах человека, имеющих фосфатидилсерин на мембране и представляющих собой смесь дискоцитов и сжатых клеток [16]. Таким образом, стимуляция рецепторного пути апоптоза может иметь важное физиологическое значение для процессов гибели эритроцитов (эриптоза), по крайней мере в некоторых условиях.

Ранее мы показали, что ионный фтор (из NaF) индуцирует преждевременную апоптоз-подобную гибель эритроцитов крысы как в условиях *in vitro* [17], так и после длительного потребления крысами избыточных доз фторида *in vivo* [18]. Целью представленной работы было выяснить, способны ли ионы фтора активировать каспазы и мембранные рецепторы клеточной гибели Fas в эритроцитах крысы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальные животные. Эксперименты проводили на эритроцитах, выделенных из крови аутбредных крыс линии Wistar возрастом 8-12 нед и весом 150–200 г. Животные содержались в условиях вивария при температуре $20-23^{\circ}$ С и освещении 12 ч свет/12 ч темнота, имели свободный доступ к стандартной диете и воде с низким содержанием фтора (0.4 ppm). Все экспериментальные процедуры соответствовали международным нормам по содержанию и использованию животных в научных целях (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011).

Приготовление суспензии эритроцитов. Крыс анестезировали диэтиловым эфиром, после чего рассекали брюшную аорту и собирали кровь в пробирки с гепарином. Кровь немедленно центрифугировали в течение 5 мин при 3000 g и 4°С, плазму и верхний слой белых клеток удаляли, а эритроциты отмывали три раза холодным стандартным раствором (137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, 5 мМ NaHCO₃, 0.3 мМ Na₂HPO₄, 0.4 мМ KH₂PO₄, рН 7.4 при 4°С). Отмытые клетки ресуспендировали в этом же растворе до гематокрита 10%. Для экспериментов аликвоты суспензии эритроцитов добавляли в 500 мкл инкубационной среды, содержащей 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, 5 мМ NaHCO₃, 0.3 мМ Na₂HPO₄, 0.4 мМ KH₂PO₄, 5 мМ глюкозы и 1% (w/v) пенициллина-стрептомицина (pH 7.4 при 37°C), до гематокрита 1%. Клетки инкубировали в присутствии увеличивающихся концентраций NaF (0.1–10 мМ) в течение 1, 5 и 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% O₂.

Изучение активности каспаз 8 и 3. Активности каспазы-8 и каспазы-3 оценивали с помощью соответствующих наборов CaspGLOWTM, в которых используются ингибиторы каспазы-8 и каспазы-3 IETD-FMK и DEVD-FMK, соответственно, конъюгированные с флуоресцентной меткой FITC. Эти соединения нетоксичны и хорошо проникают в клетки, где необратимо связываются с каспазами после их стимуляции. Флуоресцентная метка FITC позволяет напрямую регистрировать активные каспазы в апоптотических клетках. Процедура мечения проводилась в соответствии с рекомендациями производителя. После 1, 5- и 24-ч обработки NaF из каждой пробы брали аликвоты (100 мкл), к которым добавляли флуорогенные субстраты FITC-IETD-FMK и FITC-DEVD-FMK, и клетки инкубировали в течение 1 ч при тех же условиях. Затем эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 3 мин, отмывали еще 2 раза холодным стандартным раствором, ресуспендировали в этом же растворе до гематокрита 0.1% и помещали на лед. Флуоресценцию клеток анализировали методом проточной цитометрии в канале FL-1 цитометра EPICS XL (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), используя программу SYSTEM II (Version 3.0).

Экспрессия рецептора Fas. Возможные изменения экспрессии Fas оценивали методом иммуноблоттинга. Для этих экспериментов эритроциты инкубировали в течение 1, 5 и 24 ч с 0.1, 1 и 10 мМ NaF. После окончания обработки клетки лизировали холодным гипотоническим раствором, содержащим 10 мМ Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1 мМ ЭДТА и ингибиторы клеточных протеаз (pH 7.4 при 4°C). Общее содержание белка в лизатах определяли методом Лоури. Клеточные белки (100 мкг из каждой пробы) разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифическое связывание мембран блокировали 5% раствором обезжиренного сухого молока в буфере TBS (150 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7.4 при 20°С). Мембраны последовательно инкубировали с первичными антителами, специфичными для Fas (разведение 1:200), и с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Белки, связавшиеся с антителами, проявляли с помощью хемилюминесцентного раствора. Для кон-



Рис. 1. Зависимость стимуляции каспазы-8 в эритроцитах крысы от концентрации NaF и времени инкубации с ним. Эритроциты инкубировали с 0.1-10 MM NaF в течение 1, 5 и 24 ч, затем нагружали флуоресцентной меткой FITC-IETD-FMK в течение 1 ч и измеряли активность каспазы-8 методом проточной цитометрии. * p < 0.01, ** p < 0.001 по сравнению с соответствующим контролем.

троля количества белка в пробах мембраны отмывали от Fas-специфичных антител и инкубировали с антителами к ферменту GAPDH (разведение 1 : 1000). Экспрессию белков оценивали с помощью денситометрического анализа проявленных полос, используя программу Quantity One (BioRad, USA). Показатели денситометрии полос Fas нормализовали по отношению к показателям GAPDH.

Реактивы. Все реактивы для растворов и NaF были куплены у компании Sigma Aldrich (USA), смесь пенициллина-стрептомицина – у компании "Росмедбио" (Россия). Наборы CaspGLOWTM и мышиные Fas-специфичные антитела были приобретены у фирмы BioVision Research products (USA), кроличьи антитела к GAPDH – у Santa Cruz Biotechnology (USA), вторичные анти-мышиные и анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена – у GE Healthcare (USA).

Статистическая обработка данных. Результаты экспериментов анализировали в программе SigmaPlot ver. 11.0 (Jandel Scientific). Статистическая достоверность различий между разными группами данных рассчитывалась с помощью дисперсионного анализа ANOVA в комбинации с тестом Тьюки. Данные представлены как средние \pm стандартные ошибки средних. Величина *р* меньше 0.05 считалась статистически достоверной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность каспазы-8. Результаты, представленные на рис. 1, показали, что способность NaF стимулировать инициаторную каспазу-8 в изолированных эритроцитах крысы зависит как от его дозы, так и от времени инкубации. После 1-ч инкубации достоверное увеличение числа клеток с активными каспазами-8 наблюдалось для 0.5 мМ NaF, а после 5-ч обработки – уже для 0.1 мМ NaF. Наиболее значительная стимуляция каспазы-8 отмечалась после 24-ч инкубации с 2-10 мМ NaF. Например, обработка эритроцитов 5 мМ NaF в течение суток увеличивала популяцию эритроцитов с активными каспазами-8 до ~16%. Интересно, что после 5-ч экспозиции уровень стимуляции каспазы-8 немного возрастал по сравнению с 1-ч инкубацией под влиянием низких концентраций NaF (0.1-0.5 мм), но снижался примерно в 2 раза в тех же самых пробах в присутствии относительно высоких доз фторида (2-10 мМ), хотя этот эффект не достиг статистической значимости. В контрольных условиях число клеток с активными каспазами-8 было относительно стабильным и не превышало $1.38 \pm 0.35\%$, $1.02 \pm 0.19\%$ и $1.69 \pm 0.38\%$ после 1-ч, 5-ч и 24-ч инкубации, соответственно (различия статистически недостоверны).

Активность каспазы-3. Характер стимуляции эффекторной каспазы-3 (рис. 2) в целом повторял таковой для каспазы-8. Наибольшее число эритро-



Рис. 2. Влияние различных доз NaF и времени инкубации с ним на активность каспазы-3 в эритроцитах крысы. Клетки обрабатывали 0.1-10 мМ NaF в течение 1, 5 и 24 ч, затем нагружали флуоресцентной меткой FITC-DEVD-FMK в течение 1 ч и измеряли активность каспазы-3 методом проточной цитометрии. * p < 0.01, ** p < 0.001 по сравнению с соответствующим контролем.

цитов с активными каспазами-3 (~15%) также наблюдалось после 24-ч обработки с 5 мМ NaF. Число клеток с активной каспазой-3 после 5-ч обработки NaF было статистически достоверно ниже, чем таковое из тех же самых проб после 1-ч инкубации. Следует отметить и другой факт. Так, после 1-ч экспозиции низкие концентрации NaF (0.1–2 мМ) продуцировали примерно в 2 раза больше клеток с активной каспазой-3, чем с каспазой-8. В контрольных пробах степень стимуляции каспазы-3 также оставалась постоянной в течение всего периода инкубации и составляла $1.2 \pm 0.4\%$, $0.9 \pm 0.2\%$ и $1.5 \pm 0.3\%$ после 1, 5 и 24 ч соответственно.

Экспрессия Fas. После 1-ч и 5-ч инкубации эритроцитов крысы с 0.1—10 мМ NaF достоверной стимуляции Fas не наблюдалось (рис. 3). Экспрессия Fas дозо-зависимо увеличивалась только после 24-ч обработки. В контрольных пробах активность Fas не изменялась на протяжении всего периода инкубации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты работы показали, что ионы фтора способны инициировать рецептор-зависимый путь гибели эритроцитов крысы *in vitro*. Однако кинетика стимуляции компонентов этого пути – рецепторов Fas, каспаз-8 и каспаз-3 – сильно различается. Так, активация каспаз происходит уже после 1-ч инкубации клеток с NaF (рис. 1 и 2), а заметные изменения экспрессии Fas наблюдаются только после 24-ч обработки (рис. 3). Возможно, стимуляция каспазы-8 и каспазы-3 происходит, по крайней мере частично, независимо от мембранного механизма активации Fas.

Другой интересный феномен, выявленный в нашей работе – сложная зависимость стимуляции каспаз от времени инкубации и применяемых доз NaF. Например, число клеток с активными каспазами после 5-ч обработки NaF было ниже, чем таковое из тех же самых проб после 1-ч инкубации. Особенно наглядно эта зависимость проявилась для каспазы-3. Это может означать, что стимуляция каспаз является кратковременной. Скорее всего, этот феномен отражает различное физиологическое состояние клеток. Общая популяция эритроцитов состоит из клеток разного возраста. Возможно, что в течение первого часа инкубации каспазы стимулируются только в старых клетках. К пятому часу обработки эти эритроциты заканчивают процесс апоптоза, поэтому число клеток с активными каспазами уменьшается. После 24 ч инкубации каспазы стимулируются уже в тех зрелых клетках, которые вначале были нормальными и запустили процесс преждевременной гибели, индуцированной только NaF. Подтверждением этому может служить и увеличение экспрессии Fas, наблюдаемое только после суточной обработки клеток NaF.

Внутриклеточные механизмы, лежащие в основе активации рецепторов гибели и каспаз под влиянием фторида, в настоящее время не ясны. Ана-



Рис. 3. Изменение экспрессии рецепторов Fas в изолированных эритроцитах крысы под влиянием фтора. Эритроциты инкубировали с 0.1–10 мМ NaF в течение 1, 5 и 24 ч, затем в лизатах клеток методом иммуноблоттинга оценивали экспрессию Fas. Оптическую плотность полос Fas нормализовали по оптической плотности GADPH.

лиз литературных данных показывает, что стимуляция каспаз в эритроцитах зависит от природы стимула. Так, зимогены каспазы-3 не активировались в процессе преждевременной гибели эритроцитов человека, индуцированной накоплением Ca²⁺ и обработкой Ca²⁺ ионофором А23187, хотя экстернализация фосфатидилсерина на мембранах предотвращалась ингибитором каспаз Ac-DEVD-CHO [11]. Несколько других широко применяемых индукторов клеточной гибели, в том числе стауроспорин и иономицин, также не были способны стимулировать прокаспазы-8 и -3 [12]. Наоборот, каспазы-8 и -3 активировались в эритроцитах человека в ответ на обработку прооксидантом терт-бутил-гидропероксидом (tBHP), что сопровождалось ингибированием активности фермента флиппазы (аминофосфолипид-транслоказы), перемещением фосфатидилсерина на внешний слой мембраны, протеолизом белка полосы 3 и активацией эритрофагоцитоза [13–15]. Эти же авторы продемонстрировали связывание Fas рецепторов с его лигандами [15]. Кроме того, стимуляция каспаз 8 и 3 была описана в эритроцитах человека, в которых апоптоз был индуцирован пероксинитритом [19], 9-О-ацетилированным ганглиозидом GD3 [20], в физиологически старых эритроцитах, имеющих фосфатидилсерин на мембранах [16] и после длительного хранения в условиях банка крови [20].

Исходя из этого, мы полагаем, что в зрелых эритроцитах каспазы могут быть стимулированы как старением клеток, так и окислительным стрессом, т.е. нарушением баланса между возрастающей продукцией активных форм кислорода (ROS) и активностью антиокислительных ферментов. Ранее мы показали, что обработка эритроцитов крысы NaF приводила к накоплению супероксида и перекиси водорода в условиях *in vitro* [22] и перекисей в условиях *in vivo* [18]. Хотя ионы фтора не являются ни донорами, ни акцепторами электронов из-за полностью заполненной электронной оболочки, благодаря высокой электроотрицательности они способны формировать сильные водородные связи, особенно с –ОН и – NH группами в молекулах, а также формировать комплексы с поливалентными металлами типа Al³⁺, Fe³⁺, и Mg²⁺. Таким образом, ионы фтора способны оказывать мошное влияние на ферменты, контролирующие состояние антиокислительных систем в клетках различных типов [7, 8, 23]. В условиях кровеносного русла, в котором эритроциты подвергаются многочисленным повреждающим воздействиям (осмотическому шоку в почках, окислительному стрессу в легких, механической деформации в процессе прохождения через узкие капилляры), активация каспаз может быть необходима как один из механизмов для запуска механизма элиминации старых и дефектных клеток и эритрофагоцитоза.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с государственной научной программой "Эволюция механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма и их регуляция" (№ гос. рег. 01201351572).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fluoride in drinking water // WHO (World Health Organization). K. Bailey, J. Chilton, E., Dahi, M. Lennon, P. Jackson, J. Fawell Eds., WHO Press, Switzerland, 2006.
- Pizzo G., Piscopo M.R., Pizzo I., Guiliana G. Community water fluoridation and caries prevention: a critical review // Clin. Oral Investig. 2007. V. 11. P. 189–193.
- 3. *Peckham S.* Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention // ScientificWorld Journal. 2014. 293019. http://dx.doi.org/10.1155/2014/293019
- Krishnamachari K.A. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease // Prog. Food Nutr. Sci. 1986. V. 10. P. 279–314.
- Bronckers A.L., Lyaruu D.M., DenBesten P.K. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis // J. Dent. Res. 2009. V. 88. P. 877–893.

- *Reddy D.R.* Neurology of endemic skeletal fluorosis // Neurol. India. 2009. V. 57. P. 7–12.
- Dec K., Lukomska A., Maciejewska D., Jakubczyk K., Baranowska-Bosiacka I., Chlubek D., Wasik A., Gutowska I. The influence of fluorine on the disturbances of homeostasis in the central nervous system // Biol. Trace Elem. Res. 2017. V. 177. P. 224–234.
- Barbier O., Arreola-Mendoza L., Del Razo L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity // Chem.-Biol. Interact. 2010. V. 188. P. 319–333.
- Agalakova N.I., Gusev G.P. Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride // ISRN Cell Biol. 2012. ID 403835. http://dx.doi.org/ 10.5402/2012/403835
- Ribeiro D.A., Cardoso C.M., Yujra V.Q., De Barros Viana M., Aguiar O.Jr, Pisani L.P., Oshima C.T.F. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870895 Fluoride Induces Apoptosis in Mammalian Cells: In Vitro and In Vivo Studies // Anticancer Res. 2017. V. 37. P. 4767– 4777.
- Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quantannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria // Cell Death, Differ. 2001. V. 8, P. 1143–1156.
- Berg C.P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoit of mitochondrial regulators of apoptosis // Cell Death Differ. 2001. V. 8. P. 1197–1206.
- Mandal D., Moira P.K., Basu J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes // FEBS Lett. 2002. V. 513. P. 184–188.
- Mandal D., Baudin-Creuza V., Bhattacharyya A., Pathak S., Delaunay J., Kundu M., Basu J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3) // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 52551–52558.
- Mandal D., Mazumder A., Das P., Kundu M., Basu J. Fas, caspase 8-, and caspase- 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 39460–39467.
- Bratosin D., Tcacenco L., Sidoroff M., Cotoraci C., Slomianny C., Estaquier J., Montreuil J. Active caspases-8 and -3 in circulating human erythrocytes purified on immobilized annexin-V: a cytometric demonstration // Cytometry. 2009. V. 75A. P. 236–244.
- Agalakova N.I., Gusev G.P. Fluoride-induced death of rat erythrocytes in vitro // Toxicol. In Vitro. 2011. V. 25. P. 1609–1618.
- Agalakova N.I., Gusev G.P. Excessive fluoride consumption leads to accelerated death of erythrocytes and anemia in rats // Biol. Trace Elem. Res. 2013. V. 153. P. 340–349.
- Pietraforte D., Matarrese P., Straface E., Gambardella L., Metere A., Scorza G., Leto T.L., Malorni W., Minetti M. Two different pathways are involved in peroxynitrite-induced senescence and apoptosis of human erythrocytes // Free Radic. Biol. Med. 2007. V. 42. P. 202–214.

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 55 № 2 2019

- Mukherjee K., Chowdhury S., Mondal S., Mandal C., Chandra S., Bhadra R.K., Mandal C. 9-O-Acetylated GD3 triggers programmed cell death in mature erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 362. P. 651–657.
- 21. Kriebardis A.G., Antonelou M.H., Stamoulis K.E., Economou-Petersen E., Margaritis L.H., Papassideri I.S. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding,

lipid raft rearrangement, and caspase activation // Transfusion. 2007. V. 47. P. 1212–1220.

- Agalakova N.I., Gusev G.P. Fluoride induces oxidative stress and ATP depletion in the rat erythrocytes in vitro // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012. V. 34. P. 334–337.
- 23. *Burgstahler A.W.* Recent research on fluoride and oxidative stress // Fluoride. 2009. V. 42. P. 73–74.

Activation of Fas Receptors, Caspase-8 and Caspase-3 by Fluoride Ions in Rat Erythrocytes *In vitro*

N. A. Agalakova^{*a*,[#]}, T. I. Petrova^{*a*}, and G. P. Gusev^{*a*}

^a Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia [#]e-mail: nagalak@mail.ru

The goal of the study was to demonstrate the ability of fluoride ions (F^-) to activate key components of the receptor-dependent apoptotic pathway – membrane Fas receptors, caspase-8 and caspase-3 – in rat erythrocytes *in vitro*. Cells were incubated in the presence of increasing NaF concentrations (0.1–10 mM) for 1, 5 and 24 h. Caspase-8 and caspase-3 activities were assayed by flow cytometry, expression of Fas receptors – by immunoblotting. It was found that the kinetics of stimulation of Fas receptors, caspase-8 and caspase-3 in rat erythrocytes by fluoride ions differs depending both on the fluoride concentration and exposure time. For instance, activation of caspases was observed as early as 1 h after incubation with fluoride, while treatment of erythrocytes with 5 mM NaF for 24 h increased the cell population with active caspases-8 and caspases-3 up to ca 15–16%. At the same time, expression of Fas receptors increased in a concentration-dependent manner only after 24 h of incubation with NaF. Thus, one of the mechanisms underlying premature death of rat erythrocytes induced by fluoride *in vitro* is the ability of the latter to stimulate messengers of the receptor-dependent apoptotic pathway. However, it is possible that caspase-8 and caspase-3 activation is, at least in part, independent of the membrane-associated mechanism of activation of Fas receptors.

Keywords: Rat erythrocytes, fluoride ions, caspases, Fas receptors