

# Внутриклеточный pH как ранний дифференциальный маркер глюкокортикоид-индуцированного апоптоза фибробластов кожи

А.С.Духанин, П.А.Малкин, Н.Л.Шимановский

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В.Сергеева медико-биологического факультета, Москва  
(зав. кафедрой – чл.-кор. РАМН, проф. Н.Л.Шимановский)

Ранние этапы апоптоза фибробластов, индуцированного дексаметазоном, включают изменения внутриклеточного гомеостаза, которые определяются уменьшением pH цитоплазмы и увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Молекулярными мишенями действия дексаметазона являются  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменник и кальциевые каналы плазматических мембран.

Ключевые слова: апоптоз, внутриклеточный pH, кальций, глюкокортикоиды, фибробласты

## Intracellular pH as the Early Differential Marker of Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Skin Fibroblasts

A.S.Dukhanin, P.A.Malkin, N.L.Shimanovskiy

Pirogov Russian National Research Medical University, Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology named after Academician P.V.Sergeev of Medical-Biological Faculty, Moscow  
(Head of the Department – Corr. Member of RAMS, Prof. N.L.Shimanovskiy)

Early stages of dexamethasone-induced fibroblast apoptosis include changes in intracellular homeostasis determined by decreasing pH of the cytoplasm and increased intracellular calcium ion concentration.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -transporter and plasma membrane calcium channels are molecular targets for the action of dexamethasone.

Key words: apoptosis, intracellular pH, calcium, glucocorticoids, fibroblasts

Апоптотический процесс, лежащий в основе фармакологического действия глюкокортикоидов при лечении многих аллергических заболеваний, можно разделить на две последовательные стадии [1, 2]. Первая включает ранние биохимические изменения (нарушение кальциевого гомеостаза, исчезновение мембранных потенциалов, снижение внутриклеточного pH и др.), степень проявления которых зависит от природы индуктора апоптоза. Вторая стадия — морфологические изменения клетки, которые можно наблюдать с помощью светового микроскопа (уменьшение объема клетки, кариорексис, образование апоптотических телец и др.). Однако многие из вышеперечисленных биохимических и морфологических изменений встречаются отдельно сами по себе при различных формах клеточной активности, при некротической гибели клетки и не могут быть отнесены к фармако-

биохимическим маркерам апоптоза. Таким образом, последовательность начальных этапов апоптоза, приводящих к запрограммированной гибели клетки, на сегодняшний день остается мало изученной. Кроме того, недостаточно ясно, после какого этапа апоптотические изменения становятся необратимыми и клетка неминуемо гибнет.

Целью настоящей работы было определение фармакобиохимических маркеров начальных этапов апоптоза фибробластов, индуцированного глюкокортикоидами.

### Материалы и методы

Внутриклеточный уровень свободных ионов кальция определяли с помощью флуоресцентного индикатора Fura-2/AM по описанной ранее методике [3]. Величину цитоплазматического pH в клетках оценивали с помощью флуоресцентного зонда BCECF/AM [4]. Для индукции некротической формы гибели фибробластов использовали экспериментальную модель окислительного стресса. Клетки инкубировали в присутствии *t*-бутилгидропероксида (БГП) — химического вещества, вызывающего окислительную деструкцию клеток в течение 8–12 ч. В нашей работе оценивалось изменение внутриклеточного pH ( $\text{pH}_{\text{вн}}$ ,  $\text{pH}_i$ ) в первые 1,5 ч инкубации, поскольку дальнейшее увеличение времени инкубации приводило к на-

#### Для корреспонденции:

Духанин Александр Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В.Сергеева медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (495) 766-4399

E-mail: das03@rambler.ru

Статья поступила 16.07.2012, принята к печати 19.12.2012

рушению целостности клеток, регистрируемому при световой микроскопии.

Для статистической обработки полученных результатов был использован параметрический метод Стьюдента. Данные приведены в виде значений среднего арифметического  $\pm$  доверительный интервал (при уровне значимости, равном 0,05).

### Результаты исследования и их обсуждение

Постоянство внутриклеточного pH в покоящихся клетках определяется буферными свойствами внутриклеточных компонентов: белков, нуклеотидов, неорганических фосфатов и карбонатов. Активным компонентом  $H^+$ -обмена служит  $Na^+/H^+$ -переносчик, локализованный в плазматической мембране и осуществляющий обмен внеклеточного иона натрия на внутриклеточный протон. Движущей силой переноса является электрохимический градиент  $Na^+$  (потенциал покоя плазматической мембраны фибробластов составляет примерно -60 мВ).

В задачи первой части исследования входило изучение влияния глюкокортикоидов на величину  $pH_{вн}$  с помощью флуоресцентного зонда BCECF, сравнение закономерностей изменения  $pH_{вн}$  при апоптотической и некротической формах гибели фибробластов. Величина  $pH_{вн}$  в контрольных образцах клеток, в отсутствие химического воздействия (контроль 1), составляла  $7,12 \pm 0,05$  ( $n = 6$ ) и незначительно изменялась в течение всего времени наблюдения. Через 1,5 ч значение  $pH_{вн}$  в контрольных пробах составляло  $7,03 \pm 0,05$  ( $n = 3$ ).

В стандартных условиях эксперимента значение pH инкубационной среды ( $pH_{внеш}$ ) составляло  $7,35 \pm 0,02$ . В начальный момент времени значение  $pH_{вн}$  в клетках, подвергшихся воздействию БГП, равнялось  $7,09 \pm 0,06$  ( $n = 4$ ) и достоверно не отличалось от такового в контрольных клетках. По мере увеличения времени инкубации с БГП величина  $pH_{вн}$  плавно повышалась, выходя на плато к 75-й минуте наблюдения (рис. 1, кривая 1). При этом конечное значение  $pH_{вн}$  составляло  $7,35 \pm 0,04$  ( $n = 4$ ), что соответствовало величине  $pH_{внеш}$ . Можно предположить, что наблюдается выравнивание pH во внеклеточном и внутриклеточном пространствах.

Для проверки этого предположения была использована инкубационная среда со значением  $pH_{внеш}$ , равным  $7,5 \pm 0,02$ . В новых условиях эксперимента динамика изменений  $pH_{вн}$  в целом имела сходный характер, однако конечные значения  $pH_{вн}$  составляли уже  $7,51 \pm 0,07$  ( $n = 3$ ) (рис. 1, кривая 2). Сле-

дует отметить, что значения  $pH_{вн}$  в контрольных образцах фибробластов (контроль 2), инкубируемых в среде с  $pH_{внеш}$  7,5, колебались в пределах 7,02–7,16, достоверно не отличаясь от уровня  $pH_{вн}$  в контроле 1.

Таким образом, при некротической форме гибели клеток наблюдаются нарушения гомеостатической функции плазматической мембраны, выражающиеся в выравнивании  $pH_{вн}$  и  $pH_{внеш}$  к 75-й мин после начала воздействия БГП. Маловероятно, что повышение  $pH_{вн}$  связано с активацией  $Na^+/H^+$ -обмена, так как добавление в суспензию клеток селективного ингибитора антипорта препарата амилорида (200 мкМ) не влияло на динамику изменения  $pH_{вн}$ .

Внесение в среду инкубации, наряду с БГП, ингибитора синтеза АТФ 2-дезоксиглюкозы и блокатора киназных реакций трифлуоперазина усугубляло нарушения клеточного гомеостаза: выравнивание  $pH_{вн}$  и  $pH_{внеш}$  регистрировали к 60-й минуте инкубации (рис. 1, кривая 3).

Апоптотическую форму гибели фибробластов индуцировали дексаметазоном (1 мкМ). Инкубация клеток с дексаметазоном приводила к закислению внутриклеточной среды. Достоверные изменения  $pH_{вн}$  регистрировали начиная с 45-й минуты инкубации (значение  $pH_{вн}$  составляло  $6,95 \pm 0,04$ ;  $n = 4$ ). В последующий отрезок времени величина  $pH_{вн}$  плавно уменьшалась и достигала значения  $6,87 \pm 0,04$  к концу наблюдения (рис. 2). Предварительное внесение в среду инкубации 2-дезоксиглюкозы и трифлуоперазина отменяло изменения  $pH_{вн}$ , индуцированные дексаметазоном. Полученные данные указывают на участие в pH-ответе фибробластов энергетически-зависимых реакций.

Для изучения молекулярных механизмов действия дексаметазона на  $Na^+/H^+$ -обмен были использованы два экспериментальных подхода, включающих оценку влияния глюкокортикоида на активацию  $Na^+/H^+$ -обмена в фибробластах с помощью ангиотензина II и активатора фосфоинозитидного обмена форболмеристатацетата (ФМА). Полученные данные суммированы в таблице. Достоверное увеличение  $pH_{вн}$  наблюдали, начиная с 45-й минуты инкубации клеток с ангиотензином II или ФМА, на 75-й минуте значения  $pH_{вн}$  составляли 7,28 и 7,32 соответственно. Подъем  $pH_{вн}$ , вызванный ангиотензином II или ФМА, блокировался амилоридом. Дексаметазон ингибировал подъем  $pH_{вн}$  на всех экспериментальных моделях.

Таким образом, ингибирующее действие дексаметазона на  $Na^+/H^+$ -обмен в фибробластах может быть отнесено к ранним, негеномным эффектам глюкокортикоидов, а ингибирование

Таблица. Влияние различных экспериментальных условий на pH фибробластов

Экспериментальные условия	Время инкубации, мин					
	0	15	30	45	60	75
Контроль	$7,12 \pm 0,05$	$7,12 \pm 0,05$	$7,10 \pm 0,06$	$7,08 \pm 0,05$	$7,06 \pm 0,05$	$7,03 \pm 0,05$
Дексаметазон, 1 мкМ	$7,10 \pm 0,04$	$7,06 \pm 0,05$	$7,02 \pm 0,04$	$6,95 \pm 0,04^*$	$6,92 \pm 0,04^*$	$6,89 \pm 0,05^*$
Ангиотензин II, 100 нМ	$7,12 \pm 0,05$	$7,17 \pm 0,05$	$7,20 \pm 0,06$	$7,25 \pm 0,04^*$	$7,30 \pm 0,05^*$	$7,28 \pm 0,05^*$
Ангиотензин II, 100 нМ + амилорид, 200 мкМ	$7,12 \pm 0,05$	-	$7,11 \pm 0,05$	-	$7,08 \pm 0,05$	-
Ангиотензин II, 100 нМ + дексаметазон, 1 мкМ	$7,12 \pm 0,05$	$7,06 \pm 0,05$	$7,12 \pm 0,04$	$7,09 \pm 0,04^{**}$	$7,08 \pm 0,04^{**}$	$7,10 \pm 0,05^{**}$
ФМА, 20 нМ	$7,11 \pm 0,05$	$7,18 \pm 0,05$	$7,21 \pm 0,04$	$7,26 \pm 0,05^*$	$7,30 \pm 0,06^*$	$7,32 \pm 0,05^*$
ФМА, 20 нМ + амилорид, 200 мкМ	$7,11 \pm 0,05$	-	$7,11 \pm 0,05$	-	$7,08 \pm 0,05$	-
ФМА, 20 нМ + дексаметазон, 1 мкМ	$7,11 \pm 0,05$	$7,06 \pm 0,05$	$7,10 \pm 0,04$	$7,06 \pm 0,04^{***}$	$7,09 \pm 0,04^{***}$	$7,11 \pm 0,05^{***}$

Условия: дексаметазон добавляли в инкубационную среду за 3–5 мин до внесения изучаемых препаратов (ФМА, ангиотензин II, амилорид). Отсчет времени в таблице указан с момента введения препаратов. Обозначения: ФМА — форболмеристатацетат. \* — достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) от контрольных значений; \*\* — достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) по отношению к действию ангиотензина II; \*\*\* — достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) по отношению к действию ФМА

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена — к ранним проявлениям апоптотического пути гибели клеток, индуцированного дексаметазоном.

В задачи второй части исследования входило исследование динамики апоптотического изменения концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме фибробластов с помощью флуоресцентного индикатора FURA-2. По нашим данным, базальный уровень [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> в фибробластах составляет в среднем 105 ± 9 нМ. Влияние дексаметазона на уровень [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> в фибробластах характеризуется дозовой и временной зависимостью (рис. 3). При концентрациях дексаметазона 0,1 и 1 мкМ наблюдается плавное нарастание [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> в течение всего времени наблюдения (0–2,5 ч). При концентрации дексаметазона 10 мкМ через 2 ч инкубации наблюдается резкое увеличение концентрации внутриклеточных ионов кальция до 187 нМ (178% от начальной величины), значение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> сохраняется и через 2,5 ч наблюдения.

При повторении эксперимента в бескальциевой среде увеличения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> не наблюдалось. Это позволило предположить, что эффект дексаметазона реализуется на уровне плазматической мембраны клеток. По-видимому, увеличение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> связано с изменением проницаемости мембраны для ионов Ca<sup>2+</sup>, а не с мобилизацией их из внутриклеточных депо. Для определения механизма изменения проницаемости мембраны при действии дексаметазона были поставлены следующие эксперименты. Одновременно с дексаметазоном в суспензию клеток вносили блокатор синтеза РНК актиномицин D или ингибитор трансляции циклогексимид. Указанные соединения достоверно изменяли динамику кальциевого ответа фибробластов на дексаметазон: отсутствовал резкий подъем уровня [Ca<sup>2+</sup>]<sub>цит</sub> через 2 ч инкубации с дексаметазоном (рис. 4). Однако тот факт, что ответ не отменялся полностью, свидетельствует о вкладе как геномных, так и негеномных механизмов глюкокортикоидного эффекта.

Нарушение процесса апоптоза (его усиление или ослабление) является основой ряда заболеваний, затрагивающих различные системы, в том числе и иммунную. К таким

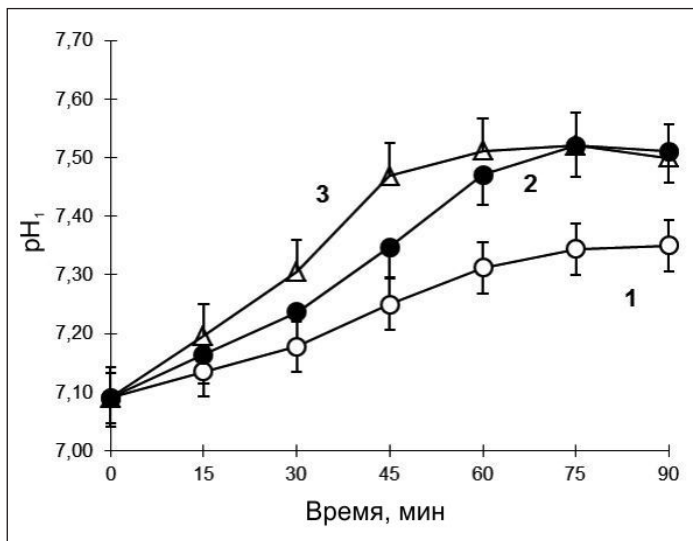


Рис. 1. Динамика изменения рН<sub>i</sub> в фибробластах при некротической форме гибели (модель окислительного стресса). Обозначения: кривая 1 — в присутствии 100 мкМ БГП, рН инкубационной среды 7,35; кривая 2 — в присутствии 100 мкМ БГП, рН инкубационной среды 7,5; кривая 3 — в присутствии 100 мкМ БГП, 30 мМ 2-дезоксиглюкозы и 50 мкМ трифлуоперазина, рН инкубационной среды 7,5.

заболеваниям относят ревматоидный артрит, псориаз, инсулинзависимый сахарный диабет и ряд других аутоиммунных патологий [6]. Патогенетические механизмы, связанные с повышенным проявлением апоптоза, являются ведущими в развитии нейродегенеративных заболеваний, последствий ишемии (включая инфаркт миокарда), апластической анемии, токсических гепатитов (в частности, алкогольных).

Апоптотическая реакция лежит в основе фармакологического действия глюкокортикоидов при лечении многих аллер-

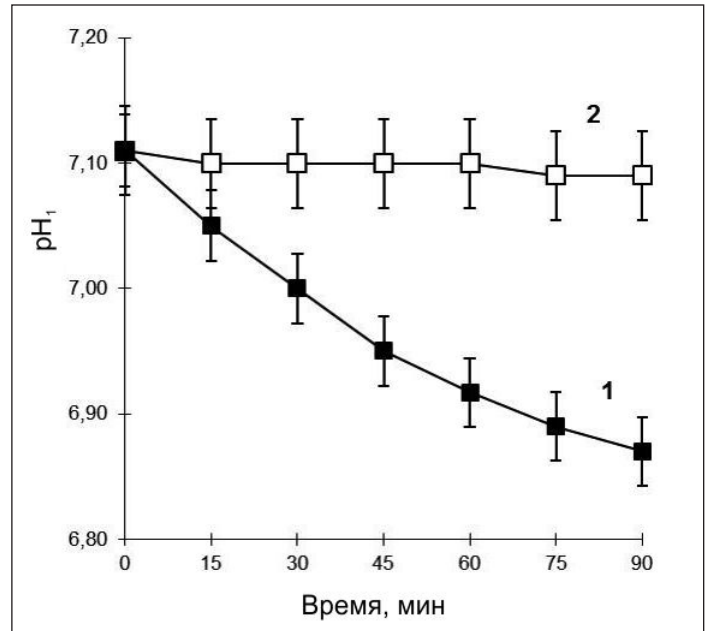


Рис. 2. Динамика изменения рН<sub>i</sub> в фибробластах при апоптотической форме гибели, индуцированной дексаметазоном. Обозначения: кривая 1 — в присутствии 1 мкМ дексаметазона; кривая 2 — в присутствии 1 мкМ дексаметазона, 30 мМ 2-дезоксиглюкозы, 50 мкМ трифлуоперазина.

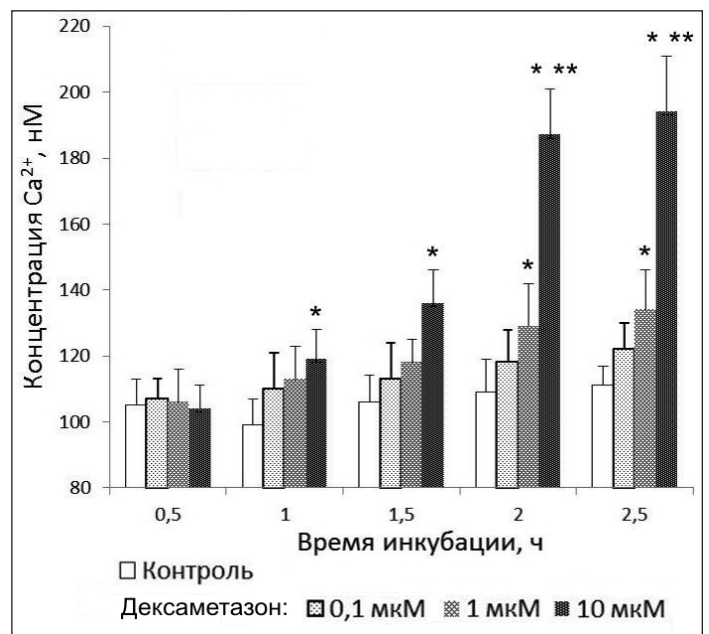


Рис. 3. Изменение концентрации цитозольного кальция в фибробластах на ранних стадиях апоптоза, индуцированного дексаметазоном. Обозначения: \* — достоверное отличие (p < 0,05) от контрольных значений; \*\* — достоверное отличие (p < 0,05) по отношению к действию 1 мкМ дексаметазона.

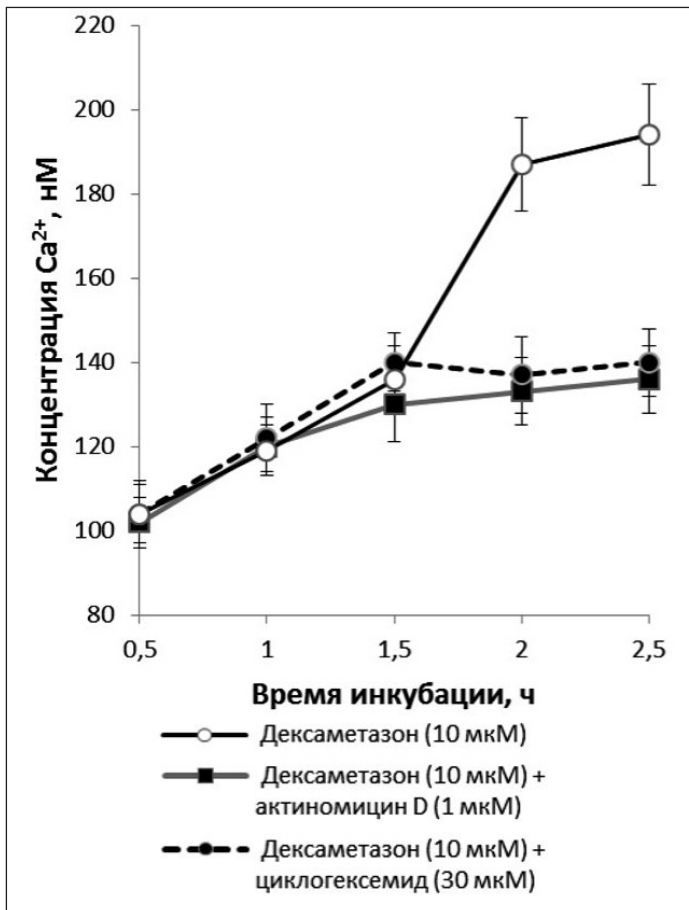


Рис. 4. Изменение концентрации цитозольного кальция в фибробластах в различных экспериментальных условиях.

гических, в том числе кожных заболеваний, в патогенезе которых принимают участие фибробласты. При этом возможны как желательные иммунодепрессивные эффекты гормональной терапии (апоптоз иммунокомпетентных Т-лимфоцитов) [1, 7], так и нежелательное атрофическое влияние стероидов на кожу (апоптоз фибробластов) [8]. В связи с этим одним из перспективных направлений для дальнейшего совершенствования этого класса лекарственных препаратов является создание средств с преимущественно внегеномным механизмом действия. Вероятно, именно это позволит повысить их клиническую эффективность и уменьшить потенциальную возможность развития нежелательного действия на кожу [9]. Один из потенциальных путей разработки новых глюкокортикоидных препаратов включает разделение геномных и негеномных эффектов за счет модификации фармакологических свойств глюкокортикоидов на основе использования наноразмерных полимеров [10].

### Выводы

1. На экспериментальной модели окислительного стресса установлено, что некротический путь лизиса фибробластов характеризуется ранними нарушениями механизмов поддержания внутриклеточного pH, значения которого выравниваются с pH внеклеточной среды после 60-й минуты инкубации с *t*-бутилгидропероксидом.

2. На экспериментальной модели апоптоза показано, что в пределах первого часа после воздействия дексаметазона

наблюдается достоверное закисление внутриклеточной среды. К одному из молекулярных механизмов pH-ответа фибробластов на действие дексаметазона относится ингибирование активности Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена.

3. Величина внутриклеточного pH может служить ранним дифференциальным маркером апоптотической и некротической форм гибели фибробластов.

*Исследование выполнено в рамках приоритетного направления развития «Инновационные технологии в изучении живых систем» Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова.*

### Литература

1. Amsterdam A., Sasson R. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis // *Mol Cell Endocrinol.* 2002. V.189. P.1–9.
2. Духанин А.С., Сергеев П.В., Патрашев Д.В. Молекулярные механизмы реализации начальных этапов глюкокортикоид-индуцированного апоптоза // *Иммунология.* 1998. №1. С.18–21.
3. Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Ханкова А.И., Духанин А.С. Исследование влияния беклола на кальцевый обмен в кардиомиоцитах с помощью флуоресцентного зонда Fura-2 // *Бюл. exper. биол. и мед.* 1996. №3. С.288–291.
4. Патрашев Д.В., Духанин А.С., Огурцов С.И. Внутриклеточный pH на ранних стадиях апоптоза и некроза тимоцитов // *Бюл. exper. биол. и мед.* 1999. №10. С.387–390.
5. Лига А.Б., Ухина Т.В., Ржезников В.М., Шимановский Н.Л. Исследование пролиферативной активности фибробластов кожи крыс при воздействии глюкокортикоидов и гестагенов // *Экспер. и клин. фармакол.* 2008. Т.71. №5. С.44–47.
6. Viegas L.R., Hoijman E., Beato M., Pecci A. Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids // *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008. V.109. P.273–278.
7. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity // *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010. V.120. P.69–75.
8. Amsterdam A., Tajima K., Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action // *Biochem Pharmacol.* 2002. V.64. P.843–850.
9. Шимановский Н.Л. Резистентность к глюкокортикоидам: механизмы и клиническое значение // *Фарматека.* 2005. №3. С.7–12.
10. Малкин П.А., Духанин А.С., Шимановский Н.Л. Использование наноразмерного кортизол-полимерного комплекса для изучения механизмов регуляции функциональной активности фибробластов кожи // *Бюл. exper. биол. и мед.* 2010. Т.148. №4. С.434–436.

### Информация об авторах:

Шимановский Николай Львович, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В.Сергеева медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 766-4157  
E-mail: shiman@rsmu.ru

Малкин Петр Александрович, заведующий учебной лабораторией кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В.Сергеева медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова  
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1  
Телефон: (495) 766-4399  
E-mail: p\_malkin@yandex.ru