
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ ЭФФЕКТОРОВ АПОПТОЗА, АУТОФАГИИ
И НЕКРОПТОЗА В КЛЕТКАХ ГИППОКАМПА КРЫС
ПОСЛЕ ИЗБЫТОЧНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ F⁻**

© 2024 г. О. В. Надей¹, Н. И. Агалакова^{1, *}

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

Поступила в редакцию 27.04.2024 г.

После доработки 02.08.2024 г.

Принята к публикации 04.08.2024 г.

В работе исследовали экспрессию маркеров апоптоза, аутофагии и некроптоза в клетках гиппокампа крыс после длительного потребления избыточных доз F⁻ на уровне транскрипции и трансляции. Самцы крыс Wistar были разделены на 4 группы, получавшие 0.4 (контроль), 5, 20 и 50 мг/л F⁻ (в виде NaF) в течение 12 месяцев. Изменения содержания эффекторов митохондриального (Bcl-2, Bax, каспазы-9, каспазы-3) и рецепторного (каспазы-8, Fas) путей апоптоза, посредников (Ulk-1, Beclin-1) и модуляторов (AMPK, Akt, mTOR) аутофагии, а также некроптоза (RIP и MLKL) в клетках оценивали методом иммуноблоттинга, экспрессию генов (*Bcl2*, *Bax*, *Casp3*, *Ulk1*, *Beclin1*, *Prkaa1*, *Akt* и *mTor*) – методом ПЦР в реальном времени. В гиппокампе животных, подвергавшихся действию F⁻, снижалось соотношение экспрессии генов *Bcl2/Bax* и белков Bcl-2/Bax, активировались каспаза-9 и каспаза-3, однако уровень каспазы-8 и мембранного рецептора Fas оставался стабильным. Длительное потребление F⁻ не оказало влияния на содержание инициаторного белка аутофагии Ulk-1 и протеинкиназ AMPK, Akt и mTOR, но привело к ингибированию ключевого посредника аутофагии Beclin-1. Уровни экспрессии эффекторов некроптоза RIP и MLKL также не изменялись в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F⁻. Таким образом, длительное воздействие F⁻ сопровождалось активацией апоптоза, преимущественно по митохондриальному пути, на фоне подавления аутофагии.

Ключевые слова: крыса, гиппокамп, ионы фтора, апоптоз, аутофагия, некроптоз

DOI: 10.31857/S0869813924090062, **EDN:** AJZMRG

ВВЕДЕНИЕ

Соединения фтора (F) очень широко распространены в окружающей среде вследствие выброса в атмосферу и воду из природных и антропогенных источников [1, 2]. В регионах, где концентрация F⁻ в воде, доступной для повседневного использования населением, превышает предельно допустимый уровень (1.5 мг/л), проживают около 300 миллионов человек. Такие регионы есть и на территории России [3]. За исключением чая и морской рыбы, содержание F⁻ в пищевых продуктах незначительно, поэтому основным путем его поступления в организм человека и животных является вода

[2, 4, 5]. В развитых странах большой вклад в потребление F⁻ человеком вносит его намеренное добавление в питьевую воду, молоко, соль, а также стоматологическую продукцию и препараты для лечения остеопороза [1, 4, 6]. Случаи хронических или острых отравлений F⁻ регистрируются на промышленных предприятиях по производству металлов, топлива и удобрений, на сельскохозяйственных предприятиях, интенсивно применяющих пестициды и фосфатные удобрения, при использовании угля для отопления и чистящих средств в быту. В результате поступление F⁻ в организм может быть бесконтрольным и приводить к развитию флюороза – дегенеративного заболевания зубной и костной тканей [4, 7].

Однако в последние десятилетия появилось достаточно много работ о негативном влиянии F⁻ на другие системы организма, в том числе о патологических изменениях в ЦНС. Обладая способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, F⁻ накапливается в различных отделах мозга и провоцирует множество неврологических и когнитивных расстройств [8–10]. Клинические обследования населения, проживающего в районах эндемического флюороза, выявили изменения локомоторной активности, ухудшение памяти и интеллектуальных способностей у взрослых, нарушение формирования памяти, дефицит абстрактного мышления и снижение среднего уровня IQ у детей. В тканях мозга экспериментальных животных, подверженных воздействию F⁻, были описаны многочисленные патологические процессы, в частности, нарушение синаптической передачи вследствие изменения синтеза нейротрансмиттеров, активности синаптических белков и молекул внутриклеточных сигнальных каскадов, участвующих в процессах формирования памяти, экспрессии транскрипционных и нейротрофических факторов, необходимых для поддержания жизнеспособности и функционирования нейронов, и повреждения структурных компонентов цитоскелета [8–10]. Все это ставит под сомнение необходимость широкого применения фтора для профилактики заболеваний зубов и показывает необходимость пересмотра его предельно допустимых доз.

В наших предыдущих работах в гиппокампе крыс, потреблявших избыточные дозы F⁻ в течение длительного времени, были выявлены снижение когнитивных способностей, активация Ca²⁺-зависимых сигнальных молекул, патоморфологические изменения и снижение численной плотности нейронов [11, 12]. Процессы гибели нейронов строго регулируются сложной сетью сигнальных путей, активирующихся в ответ на множество стрессовых стимулов и включающих изменения экспрессии генов и активности цитоплазматических белков-посредников [13, 14]. Ранее было описано, что патологические изменения, наблюдающиеся в тканях мозга при различных нейродегенеративных заболеваниях, запускают несколько разных механизмов гибели клеток, включая апоптоз, аутофагию и некроптоз [14–17]. Какой путь гибели будет активироваться в данных конкретных условиях, зависит от типа и интенсивности стрессового воздействия и соотношения активности внутриклеточных посредников различных сигнальных каскадов. Поэтому в данном исследовании были проанализированы изменения экспрессии инициаторов и эффекторов различных путей гибели клеток: митохондриального (Bax, Bcl-2, каспазы-9, каспазы-3) и рецепторного (каспазы-8, Fas) путей апоптоза, аутофагии (AMPK, Akt, mTOR, Ulk-1, Beclin-1) и некроптоза (MLKL, RIP) в клетках гиппокампа крыс после длительного потребления F⁻.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Для работы использовали 40 самцов крыс Wistar, полученных из вивария Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Животные содержались в стандартных условиях с температурой воздуха 22–25 °С и циклом освещения/темнота 12 ч/12 ч, получая корм из натуральных ингредиентов с низким содержанием F⁻ и воду *ad libitum*.

В 6-недельном возрасте крысы были произвольно разделены на 4 группы по 10 особей в каждой. Животные из контрольной группы получали обычную воду с фоновым содержанием 0.2–0.4 мг F⁻/л. Крысам из других групп добавляли в воду 5 мг F⁻/л (11.05 мг NaF/л воды), 20 мг F⁻/л (44.2 мг NaF/л) и 50 мг F⁻/л (110.5 мг NaF/л). Длительность эксперимента составила 12 месяцев. Дозы NaF, выбранные для работы, позволили получить такие уровни F⁻ в плазме крови крыс [18], которые сопоставимы с концентрациями F⁻ в плазме крови людей, потребляющих воду с содержанием F⁻ в диапазоне оптимальной и предельно допустимой концентраций (5 мг/л) или проживающих в регионах эндемического флюороза (20 и 50 мг/л) [19], учитывая более высокую (в среднем в 5 раз) скорость выведения F⁻ из организма крыс.

Крыс выводили из эксперимента рассечением брюшной аорты после внутривентральной анестезии Золетилом-100 (100 мг/кг массы тела). Мозг разрезали по продольной щели больших полушарий, из каждой части извлекали гиппокамп и сразу же замораживали его на сухом льду. Правый гиппокамп использовали для ПЦР анализа, левый – для иммуноблоттинга. До анализа пробы хранили при –80 °С.

ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Для выделения суммарной РНК из гиппокампа 0.5 мг ткани гомогенизировали с 1 мл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Гомогенаты центрифугировали при 4 °С и 12000 g в течение 10 мин, супернатант смешивали с хлороформом (0.2 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), смесь инкубировали в течение 5–6 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 4 °С и 12000 g в течение 15 мин. К водной фазе, содержащей РНК, добавляли изопропанол (0.5 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 4 °С и 12000 g в течение 10 мин. Осадок промывали 75%-ным этиловым спиртом, перерастворяли в dH₂O и хранили при –80 °С. Общее содержание РНК в пробах (260 нм) и чистоту (260/280 нм) оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer–N50 (IMPLEN, Германия). Коэффициент поглощения при 260/280 нм превышал 1.8 во всех образцах, что указывало на их высокую чистоту.

Для синтеза кДНК путем обратной транскрипции 1 мкг РНК смешивали с 1 мкл смеси случайных декануклеотидных праймеров (Random(dN)10-primer), инкубировали 2 мин при 75 °С и останавливали реакцию на льду. К смеси добавляли 4 мкл Storage Buffer 5x (Евроген, Россия), 2 мкл смеси дезоксинуклеотидов (dNTP), 2 мкл дитиотреитола (DTT), 2 мкл деионизированной воды (dH₂O) и 1 мкл MMLV ревертазы из набора MMLV RT (Евроген, Россия). Смесь инкубировали в течение 5 мин при 25 °С, 60 мин при 42 °С и 5 мин при 70 °С. Полученную кДНК разбавляли в 10 раз dH₂O и хранили при –20 °С.

Реакции ПЦР проводили на термоциклере C1000 Touch с блоком обнаружения CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, США). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 17 мкл dH₂O, 5 мкл qPCRmix-HS SYBR Master Mix (Евроген, Россия), по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 нМ) и 1 мкл раствора исследуемого образца кДНК. Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 95 °С (5 мин) и 45 циклов амплификации, каждый из которых включал этап денатурации при 95 °С (5 с), этап отжига при 57–63 °С (10–50 с) и этап элонгации при 72 °С (30 с).

Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager. Специфичность амплификации определяли по количеству пиков кривых плавления. Для этого ампликоны подвергали термической денатурации, включающей инкубацию при 65 °С (5 с) и медленное нагревание до 95 °С, после чего измеряли флуоресценцию. Все реакции проводили в трех повторах. Все гены также анализировали без ДНК-матрицы.

Последовательности использованных праймеров (синтезированных компаний «Евроген», Россия) представлены в табл. 1. Для анализа были отобраны пары праймеров, имеющие эффективность амплификации, близкую к идеальному значению 2, и коэффициент корреляции 0.98 или выше. Температура плавления была оптимизи-

рована с помощью программы Primer Blast tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Содержание GC составляло 40–60%, размер продукта был ограничен 70–250 парами оснований. Эффективность амплификации рассчитывали по формуле $E = 10^{(1/\alpha)}$, где α – угол наклона стандартной кривой.

Относительную экспрессию целевых генов оценивали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$. В качестве референсных генов были выбраны *Ppia* и *Eef1a1*, для валидации использовали программу RefFinder, как описано ранее [20].

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени

Ген	Номер NCBI	Последовательность праймеров
<i>Bcl2</i>	NM_016993.2	Прямой: GGTGAACTGGGGGAGGATTG Обратный: GCATGCTGGGGCCATATAGT
<i>Bax</i>	NM_017059.2	Прямой: TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG Обратный: GTCCAGCCCATGATGGTTCT
<i>Casp3</i>	NM_012922.2	Прямой: AACGGACCTGTGGACCTGAA Обратный: TCAATACCGCAGTCCAGCTCT
<i>Becn1</i>	NM_001034117.1	Прямой: AGCACGCCATGTATAGCAAAGA Обратный: GGAAGAGGGAAAGGACAGCAT
<i>Prkaa1</i>	NM_019142.2	Прямой: AAACCCACAGAAATCCAAACAC Обратный: CCTTCCATTCATAGTCCAACCTG
<i>Akt1</i>	NM_033230.3	Прямой: CTCATTCAGACCCACGAC Обратный: ACAGCCCGAAGTCCGTTA
<i>Mtor</i>	NM_019906.2	Прямой: AGAACCTGGCTCAAGTACGC Обратный: AGGATGGTCAAGTTGCCGAG
<i>Eef1a1</i>	NM_175838.1	Прямой: CTCCTACTTGGTTCGTTTTGCTG Обратный: GCAGACTTGGTGACTTTGCC
<i>Ppia</i>	NM_017101.1	Прямой: AGGATTCATGTGCCAGGGTG Обратный: CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA

Иммуноблоттинг

Гиппокампы гомогенизировали в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris/HCl (pH 7.6), Triton X-100 (0.1%), ингибиторы протеаз (P8340, Sigma-Aldrich, США) и фосфатаз (1 мМ $\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 1 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$). Гомогенаты центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин для удаления неразрушенных клеток, аликвоты супернатантов отбирали для дальнейшей работы, а оставшуюся часть центрифугировали при 11000 g в течение 15 мин. Полученные супернатанты замораживали при -80°C до анализа. Общее содержание белка в пробах оценивали методом Лоури.

Полученные пробы гомогенатов гиппокампа смешивали с буфером Лэммли и нагревали при 90°C в течение 10 мин для денатурации белков. Методом SDS-PAGE электрофореза белки в пробах разделяли по молекулярной массе, используя гели с 7.5, 10%

или 12% акриламида. После разделения белки переносили из гелей на нитроцеллюлозные мембраны (GE Health Care/Life Sciences, Великобритания), неспецифическое связывание которых в течение часа блокировали 5%-ным раствором обезжиренного молока в буфере TTBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20). Затем мембраны инкубировали в течение ночи с первичными антителами к тестируемому белкам. В работе использовали кроличьи антитела производства Cell Signaling (США) – Bcl-2 (D17C4) (1: 500, #3498), Bax (1: 500, #2772), Cleaved Caspase-9 (Asp353) (1: 200, #9507), Caspase-3 (D3R6Y) (1: 500, #14220), Cleaved caspase-3 (Asp175) (5A1E) (1: 200, #9664), Caspase-8 (D35G2) (1: 500, #4790), Ulk-1 (D8H5) (1: 500, #8054), Beclin-1 (D40C5) (1: 500, #3495), Phospho-Beclin-1 (Ser30) (E1C4X) (1: 200, #35955), AMPK α (D5A2) (1: 500, #5831), Akt (pan) (C67E7) (1: 500, #4691), RIP (D94C12) (1: 750, #3493), MLKL (D2I6N) (1: 750, #14993); BioVision (США) – Fas (1: 1000, #3070R) и Sigma-Aldrich (США) – mTOR (1: 500, # SAB4501038), а также мышинные антитела Cell Signaling к Caspase-9 (C9) (1: 1000, #9508) и Cleaved Caspase-8 (Asp384) (11G10) (1: 200, #9748). В качестве вторичных использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1: 1000, GE Health Care/Life Sciences, Великобритания). Иммунопозитивный сигнал визуализировали с помощью набора хемилюминесцентных растворов ECL (GE Health Care/Life Sciences, Великобритания), используя рентгеновскую пленку и проявочные растворы фирмы СЕА (Швеция). Для нормализации экспрессии изучаемых белков мембраны инкубировали с первичными антителами мыши или кролика к GAPDH (1: 1000, sc-32233, sc-166545, sc-25778) производства Santa Cruz Biotechnology (США). Денситометрический анализ экспрессии белков проводили с помощью программы ImageJ program (NIH, США).

Результаты экспериментов анализировали в программе GraphPad Prism 8.1 (San Diego, CA, США), нормальность распределения оценивали с помощью критерия Shapiro-Wilk, для проверки выборок на выбросы использовали критерий ROUT ($\alpha = 0.05$). Статистически значимые различия определяли с помощью алгоритмов ANOVA и апостериорного теста Dunnett's. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия посредников митохондриального и рецепторного путей апоптоза в клетках гиппокампа крыс

Для анализа влияния избыточного потребления F⁻ на экспрессию посредников митохондриального каскада апоптоза были выбраны белки семейства Bcl-2 (Bcl-2 и Bax), инициаторная каспаза-9 и эффекторная каспаза-3.

Уровень мРНК гена *Bcl2*, кодирующего антиапоптотический белок Bcl-2, в клетках гиппокампа крыс, получавших F⁻, не изменялся по сравнению с таковым у животных, получавших воду с нормальным содержанием F⁻. Экспрессия гена *Bax*, кодирующего проапоптотический белок Bax, напротив, статистически значимо увеличивалась в гиппокампе животных из всех групп, подверженных действию F⁻ (рис. 1a). Содержание белка Bcl-2 снижалось по сравнению с контролем в клетках гиппокампа животных, потреблявших 20 и 50 мг/л F⁻. Наоборот, уровень экспрессии белка Bax увеличивался в гиппокампе крыс, получавших все три дозы F⁻ (рис. 1b, c). Такие изменения привели к снижению соотношения между экспрессией антиапоптотического и проапоптотического маркеров этого семейства как на уровне транскрипции (рис. 1d), так и на уровне трансляции (рис. 1e).

Средний уровень нативной формы каспазы-9 с молекулярной массой 51 kDa был низким в цитоплазме клеток гиппокампа контрольных животных, однако он повышался в гиппокампе крыс из всех групп, получавших избыток фтора (рис. 2a, b). Кроме того, в гиппокампе животных, получавших 20 и 50 мг/л F⁻, наблюдалось увеличение

содержания зрелой формы каспазы-9 с молекулярной массой 38 kDa (рис. 2а, б). Такие процессы приводят к изменению соотношения уровней экспрессии прокаспазы-9, не обладающей протеолитической активностью, и активной каспазы-9, принимающей участие в реализации программы апоптоза.

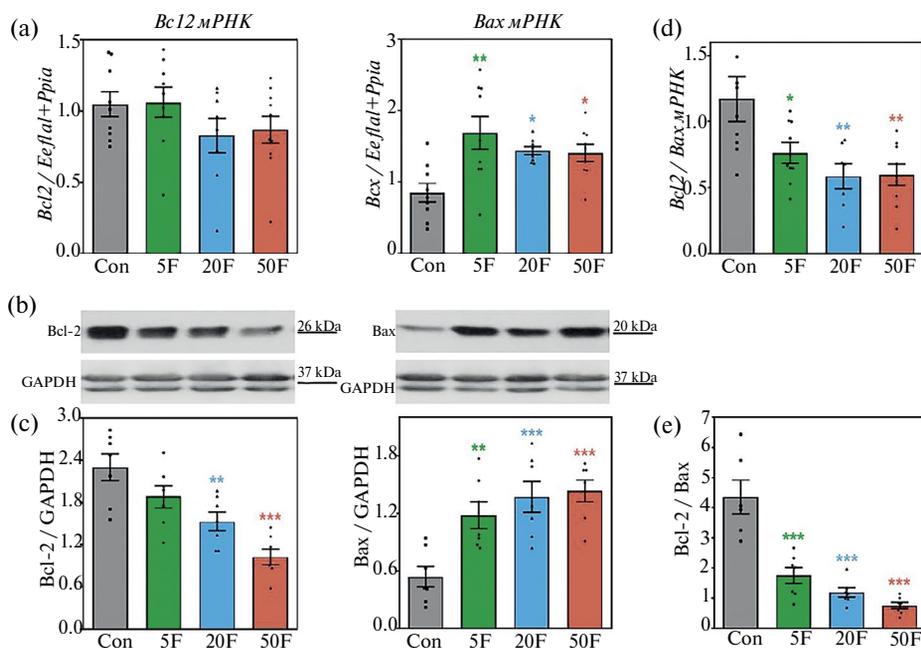


Рис. 1. Изменения экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bax в гиппокампе крыс после воздействия F⁺ на уровне транскрипции и трансляции. (а) – Уровни экспрессии генов *Bcl2* и *Bax* в клетках гиппокампа, нормализованные по отношению к экспрессии пары референсных генов *Eef1a1+Ppia* (средние значения \pm SE, $n = 7-9$). (б) – Репрезентативные иммуноблоты для одной крысы из каждой группы. (с) – Среднее содержание белков Bcl-2 и Bax \pm SE в клетках гиппокампа, рассчитанное по отношению к оптической плотности референсного белка GAPDH ($n = 7$). (d) – Отношение экспрессии генов *Bcl-2* и *Bax*. (е) – Соотношение уровней белка Bcl-2 и Bax. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контрольной группой (Con).

Экспрессия гена *Casp-3*, кодирующего один из ключевых посредников апоптоза – каспазу-3, была сравнима в клетках гиппокампа крыс из всех экспериментальных групп (рис. 3а). Однако содержание этой эффекторной молекулы изменялось на уровне белка. В гиппокампе контрольных животных практически весь клеточный пул каспазы-3 был представлен ее протеолитически неактивной проформой с молекулярной массой 32 kDa, однако у крыс, получавших 20 и 50 мг/л F⁺, уровень этой нативной формы достоверно снижался (рис. 3б, с). В противоположность этому в клетках гиппокампа крыс из контрольной группы определялись лишь небольшие количества активной каспазы-3 с молекулярной массой 17 kDa, но воздействие 5, 20 и 50 мг/л F⁺ привело к значительному увеличению ее содержания. Такие изменения уровней экспрессии прокаспазы-3 и активной каспазы В привели к смещению соотношения в сторону последней (рис. 3d) и подтверждают стимуляцию процессов апоптоза.

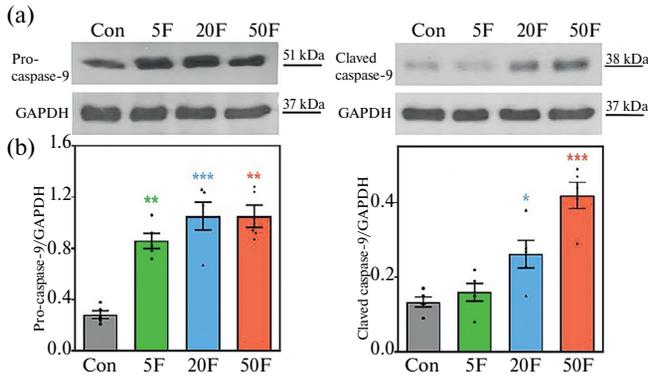


Рис. 2. Уровень каспазы-9 в гиппокампе крыс, потреблявших избыток F. (a) – Типичные примеры иммуноблотов нативной формы каспазы-9 и активной каспазы-9 для одной крысы из каждой экспериментальной группы. (b) – Среднее содержание $\pm SE$ двух форм каспазы-9, нормализованное по GAPDH ($n = 5$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

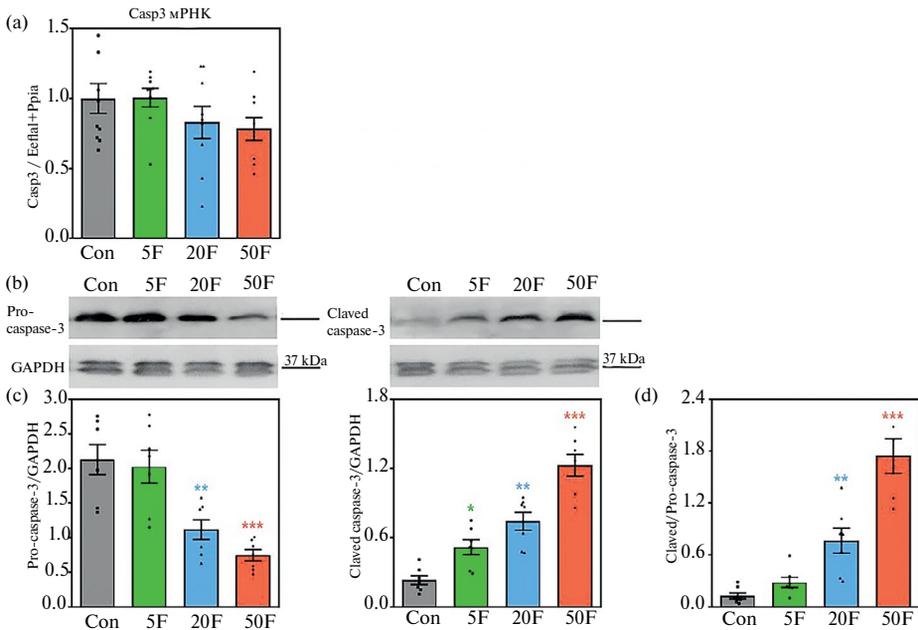


Рис. 3. Стимуляция каспазы-3 в гиппокампе крыс, потреблявших избыток F. (a) – Уровни *Casp3* мРНК в клетках гиппокампа крыс всех экспериментальных групп (средние значения $\pm SE$, $n = 8-10$). (b) – Типичные примеры иммуноблотов нативной формы каспазы-3 и активной каспазы-3 для одной крысы из каждой экспериментальной группы. (c) – Среднее содержание $\pm SE$ двух форм каспазы-3, нормализованное по GAPDH. (d) – Изменения соотношения уровней прокаспазы-3 и активной каспазы-3 ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Однако длительное воздействие избыточных доз F^- на организм крыс не оказало влияния на уровень белка одного из ключевых компонентов рецепторного пути апоптоза – каспазы-8 в клетках гиппокампа (рис. 4а, б). Содержание мембранного рецептора Fas в гиппокампе крыс, получавших избыточные дозы F^- , было сравнимо с таковым у контрольных животных (рис. 4а, б).

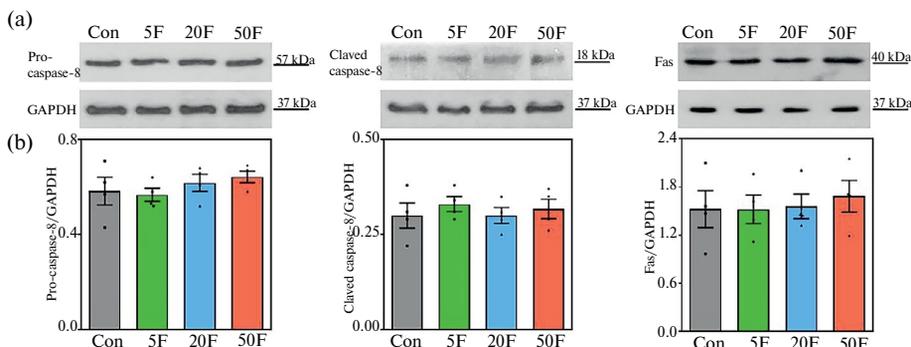


Рис. 4. Экспрессия на уровне белка двух форм каспазы-8 и рецепторов Fas в клетках гиппокампа крыс после длительного воздействия F^- . (а) – Пример иммуноблотов для одного животного из каждой группы. (б) – Среднее содержание белков каспазы-8 и Fas $\pm SE$ в клетках, рассчитанное по отношению к содержанию референсного белка GAPDH ($n = 4$).

Таким образом, длительное потребление крысами избыточных доз F^- сопровождается активацией эффикторов митохондриального, но не рецепторного пути апоптоза.

Экспрессия посредников аутофагии в клетках гиппокампа крыс, получавших избыточные дозы F^-

В клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F^- , содержание белка Ulk-1, который принимает сигналы от разнообразных внутриклеточных протеинкиназ, регулирующих процессы клеточного метаболизма, и таким образом функционирует как инициатор аутофагии, не изменялось по сравнению с таковым у контрольных крыс (рис. 5а). Однако длительное воздействие всех экспериментальных доз F^- привело к изменению экспрессии гена *Beclin1*, кодирующего белок Beclin-1, который играет важнейшую роль в процессе формирования и созревания фагофора (рис. 5б). В гиппокампе крыс, потреблявших 20 и 50 мг/л F^- , также снижались уровни нативной и фосфорилированной форм этого ключевого посредника аутофагии (рис. 5с).

Длительное потребление крысами избыточных доз F^- также не оказало влияния на уровни мРНК и белка некоторых внутриклеточных модуляторов аутофагии – киназы AMPK, функционирующей как энергетический сенсор клеток и напрямую фосфорилирующей белок Ulk-1, киназы Akt – посредника сигнального пути PI3K/Akt, регулирующего рост и выживание клеток, и киназы mTOR, предотвращающей взаимодействие Ulk1 и AMPK (рис. 6).

Влияние избыточного потребления F^- крысами на экспрессию посредников некроптоза в гиппокампе крыс

Экспрессия исследуемых посредников некроптоза – белков RIP и MLKL также не изменялась в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток фтора (рис. 7).

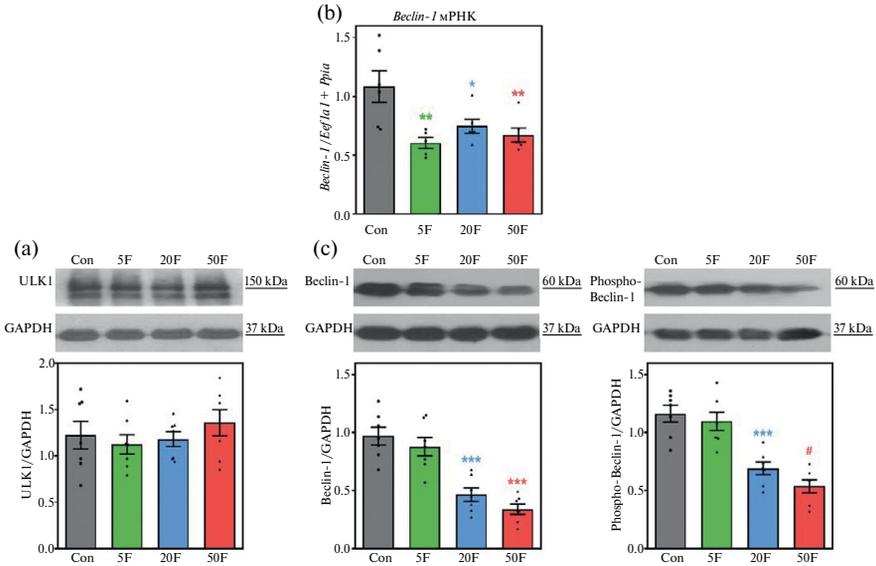


Рис. 5. Экспрессия посредников аутофагии в гиппокампе крыс, подверженных воздействию F⁻. (а) – Типичные иммуноблоты и средние уровни \pm SE белка ULK-1 в клетках гиппокампа крыс, получавших разные дозы F⁻ ($n = 7$). (б) – Изменения экспрессии гена *Beclin1* в гиппокампе животных, получавших избыток F⁻, на уровне транскрипции ($n = 6$). (с) – Изменения содержания белка Beclin-1 в гиппокампе животных после длительного потребления F⁻ ($n = 6$). Показаны типичные иммуноблоты для одного животного из каждой группы и средние значения \pm SE нативной и фосфорилированной (Ser30) Beclin-1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.0001$ по сравнению с контролем.

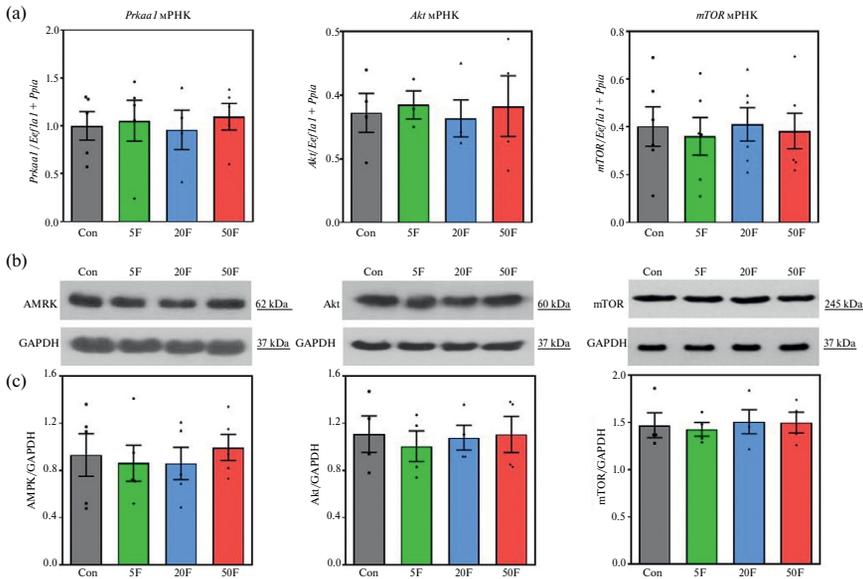


Рис. 6. Экспрессия модуляторов аутофагии AMPK, Akt и mTOR в гиппокампе крыс, получавших избыток F⁻, на уровне транскрипции и трансляции. (а) – Уровни экспрессии генов *Prkaa1*, *Akt* и *mTOR* в клетках гиппокампа крыс. (б) – Репрезентативные иммуноблоты для одного животного из каждой группы. (с) – Средние значения \pm SE содержания AMPK, Akt и mTOR на уровне белка ($n = 5$).

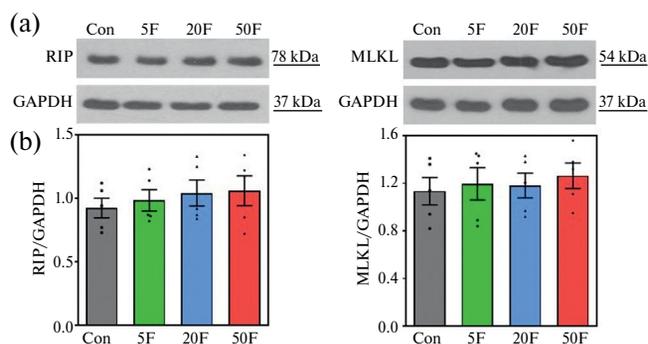


Рис. 7. Уровни белков RIP и MLKL в гиппокампе крыс, получавших разные дозы F. (а) – Показательные иммуноблоты для одного животного из каждой группы. (б) – Средние значения содержания \pm SE белков RIP и MLKL в клетках гиппокампа ($n = 5$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования показали, что длительное потребление крысами избыточных количеств F⁻ привело к изменениям экспрессии маркеров гибели клеток, функционирующих как регуляторы митохондриального пути апоптоза, в частности, к снижению уровня антиапоптотического белка Bcl-2, но активации проапоптотического белка Вах, инициаторной каспазы-9 и эффекторной каспазы-3 (рис. 1–3). Однако воздействие F⁻ не оказало влияния на экспрессию каспазы-8 и мембранных рецепторов Fas – важнейших эффекторов рецепторного пути апоптоза (рис. 4).

Апоптоз представляет собой многоступенчатый и хорошо контролируемый тип клеточной гибели, играющий ключевую роль в процессах разрушения и утилизации поврежденных или лишних клеток как в ходе нормального физиологического развития и роста организма, так и при патологических состояниях [13–15]. Семейство Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) включает в себя несколько белков, функционирующих как активаторы каспаз [21, 22]. Располагаясь на внешней мембране митохондрий, Bcl-2 связывает проапоптотические белки (в том числе Вах), таким образом подавляя их активность и обеспечивая целостность мембраны. Если уровень Bcl-2 снижается, Вах олигомеризуется и образует поры на внешней мембране митохондрий, что увеличивает ее проницаемость и приводит к выходу нескольких белков, включая цитохром С, из межмембранного пространства в цитоплазму клеток. Эти и множество других летальных стимулов, формирующихся внутри клеток или на их мембранах, последовательно стимулируют инициаторные (каспазы-2, -8, -9, -10, -12) и эффекторные (каспазы-3, -6 и -7) каспазы – цистеиновые протеазы, участвующие в протеолитическом расщеплении клеточных субстратов и разрушении клеточных компонентов [23, 24]. Таким образом, белки Bcl-2 и каспазы являются ключевыми игроками сигнальных каскадов митохондриального каскада апоптоза.

Апоптотическая трансформация клеток мозга экспериментальных животных, подверженных действию F⁻, и клеток нейрональных линий, культивируемых в присутствии высоких концентраций F⁻, была описана в нескольких работах ранее [25, 26]. Например, число апоптотических клеток увеличивалось в поле гиппокампа CA3 18-дневных эмбрионов и крысят первых 28 дней жизни, чьи матери потребляли 45–50 мг/л F⁻ в период гестации и лактации [27, 28]. Повышенный уровень апоптоза также наблюдался

в гиппокампе или целом мозге взрослых крыс, подвергавшихся воздействию 50–100 мг/л NaF в течение 6 месяцев [28–31]. Гибель клеток микроглии была описана у крыс, потреблявших 60–120 мг/л F⁻ в течение 10 недель [32]. Развитие апоптоза сопровождалось ингибированием активности белка Bcl-2, но увеличением экспрессии белка Bax, каспазы-12, каспазы-9, каспазы-3, высвобождением PARP и цитохрома C как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции [27, 31, 32]. Снижение экспрессии Bcl-2, но стимуляция Bax и каспазы-3 были выявлены и в клетках нейробластомы линий PC12 и SH-SY5Y, культивируемых с NaF [33, 34].

Одновременно со стимуляцией эффекторов апоптоза в клетках гиппокампа крыс, потреблявших избыток F⁻ в течение года, наблюдалось ингибирование ключевого посредника аутофагии Beclin-1 (рис. 5), хотя экспрессия инициаторного белка аутофагии Ulk-1 (рис. 5) и его модуляторов AMPK, Akt и mTOR (рис. 6) не изменялась. Аутофагия представляет собой сложный катаболический процесс, характеризующийся формированием аутофагосом, доставляющих поврежденные белки и органеллы к лизосомам, что приводит к образованию аутолизосом с последующей деградацией и утилизацией содержимого [14, 15]. Аутофагия обычно активируется в ответ на недостаток питательных веществ, а нарушение ее процессов в клетках мозга часто наблюдается при различных нейродегенеративных заболеваниях [16, 17]. Каскад киназ PI3K/Akt/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/Akt kinase/mammalian target of rapamycin) является одним из важнейших сигнальных путей, контролируемых такие клеточные функции, как пролиферация, рост, метаболизм и выживание [35]. Белок Ulk-1 критически необходим для ранних этапов биогенеза аутофагосом и играет центральную роль в индукции аутофагии, запуская каскад фосфорилирования нижестоящих эффекторов в составе белковых комплексов. Протеинкиназа AMPK фосфорилирует Ulk-1 по нескольким аминокислотным остаткам, включая Ser317, Ser555 и Ser777, в то время как mTOR фосфорилирует Ulk-1 по Ser757 и нарушает взаимодействие между Ulk-1 и AMPK. В свою очередь, Ulk-1 фосфорилирует ключевой посредник аутофагии – Beclin-1, который локализуется около митохондрий и в нормальных клетках ингибирует этот тип клеточной гибели, образуя комплексы с антиапоптотическими белками Bcl-2 и Bcl-xL [36–38]. Однако стрессовые стимулы приводят к диссоциации Beclin-1 от Bcl-2 вследствие конкурентного взаимодействия Bcl-2 и Bax. Активный свободный Beclin-1 вместе с киназой PI3K запускает формирование и созревание фагофора. Если же уровень Bcl-2 в клетках снижается, Beclin-1 деактивируется и начинается процесс апоптоза. Таким образом, кинетика взаимодействия Beclin-1 и Bcl-2 является одним из основных факторов выбора клеток между аутофагией и апоптозом.

В нашем исследовании длительное отравление крыс F⁻ привело к подавлению важнейшего посредника аутофагии и смещению механизмов гибели клеток гиппокампа в сторону апоптоза, вероятнее всего, через нарушение взаимодействия Beclin-1 и Bcl-2 или истощение клеточного пула этих молекул. Однако в нескольких предыдущих исследованиях, наоборот, была описана активация ключевых маркеров аутофагии в мозге лабораторных животных. Так, в гиппокампе крыс, получавших 25–100 мг/л F⁻ в течение 6 месяцев, было выявлено значимое повышение уровней Beclin-1, LC3-II и p62 [39, 40]. Мы полагаем, что такое расхождение может быть связано с разной длительностью воздействия F⁻. Аутофагия часто используется клетками как альтернативный источник энергии, поэтому ее активация после короткого действия стрессовых стимулов может быть адаптивным компенсаторным ответом, чтобы избежать гибели. В случае продолжительного влияния неблагоприятных факторов на клетки уровней или активности эффекторов аутофагии может быть недостаточно, поэтому активируются процессы апоптоза.

Экспрессия посредников некроптоза RIP и MLKL также оставалась стабильной в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F⁻ (рис. 7). Некроптоз, один из путей некротического типа гибели, запускается разнообразными воспалительными сигнала-

ми и негативно регулируется каспазами. Этот механизм инициируется через комплексы, называемые некросомами и состоящие из киназ RIP (receptor-interacting protein) и их мишеней MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) [14, 41]. Возможное участие некроптоза в реализации патологических процессов в мозге лабораторных животных под действием F^- не было исследовано ранее, однако наша работа показала, что токсические эффекты F^- на клетки гиппокампа крыс даже после продолжительного воздействия не связаны с активацией этого типа гибели.

Таким образом, морфологические изменения и гибель клеток гиппокампа, включая нейроны, описанные в нашем предыдущем исследовании, осуществляются преимущественно по митохондриальному пути апоптоза на фоне ингибирования аутофагии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (Н. И. А.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (Н. И. А., О. В. Н.), обработка результатов (Н. И. А., О. В. Н.), написание и редактирование текста (Н. И. А., О. В. Н.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания № 075–00264–24–00 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Исследование проведено с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 9/2020 от 24.09.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnston NR, Strobel SA (2020) Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. Arch Toxicol 94(4): 1051–1069. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02687-5>
2. Shaji E, Sarath KV, Santosh M, Krishnaprasad PK, Arya BK, Manisha S Babu (2024) Fluoride contamination in groundwater: a global review of the status, processes, challenges, and remedial measures. Geosci Front 15: 101734. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2023.101734>
3. Makeeva IM, Volkov AG, Musiev AA (2017) Эндемический флюороз зубов – причины, профилактика и лечение. Росс стоматол журн 21(6): 340–344. [Makeeva IM, Volkov AG, Musiev AA (2017) Endemic fluorosis of teeth – causes, prevention and treatment. Russ Stomatol J 21(6): 340–344. (In Russ)].
4. Lubojanski A, Piesiak-Panczyszyn D, Zakrzewski W, Dobrzynski W, Szymonowicz M, Rybak Z, Mielan B, Wiglusz RJ, Watras A, Dobrzynski M (2023) The safety of fluoride compounds and their effect on the human body—a narrative review. Materials (Basel) 16(3): 1242. <https://doi.org/10.3390/ma16031242>

5. *Taher MK, Momoli F, Go J, Hagiwara S, Ramoju S, Hu X, Jensen N, Terrell R, Hemmerich A, Krewski D* (2024) Systematic review of epidemiological and toxicological evidence on health effects of fluoride in drinking water. *Crit Rev Toxicol* 6: 1–33.
<https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2295338>
6. *Petrović B, Kojić S, Milić L, Luzio A, Perić T, Marković E, Stojanović GM* (2023) Toothpaste ingestion-evaluating the problem and ensuring safety: systematic review and meta-analysis. *Front Public Health* 11: 1279915.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1279915>
7. *Veneri F, Iamandii I, Vinceti M, Birnbaum LS, Generali L, Consolo U, Filippini T* (2023) Fluoride exposure and skeletal fluorosis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Curr Environ Health Rep* 10(4): 417–441.
<https://doi.org/10.1007/s40572-023-00412-9>
8. *Agalakova NI, Nadei OV* (2020) Inorganic fluoride and functions of brain. *Crit Rev Toxicol* 50(1): 28–46.
<https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1722061>
9. *Ottappilakkil H, Babu S, Balasubramanian S, Manoharan S, Perumal E* (2023) Fluoride induced neurobehavioral impairments in experimental animals: a brief review. *Biol Trace Elem Res* 201(3): 1214–1236.
<https://doi.org/10.1007/s12011-022-03242-2>
10. *Veneri F, Vinceti M, Generali L, Giannone ME, Mazzoleni E, Birnbaum LS, Consolo U, Filippini T* (2023) Fluoride exposure and cognitive neurodevelopment: systematic review and dose-response meta-analysis. *Environ Res* 221: 115239.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115239>
11. *Nadei OV, Khvorova IA, Agalakova NI* (2020) Cognitive decline of rats with chronic fluorosis is associated with alterations in hippocampal calpain signaling. *Biol Trace Elem Res* 197(2): 495–506.
<https://doi.org/10.1007/s12011-019-01993-z>
12. *Надей ОВ, Иванова ТИ, Суфиева ДА, Агалакова НИ* (2020) Морфологические изменения нейронов гиппокампа крыс как результат избыточного потребления фтора. *Журн анат гистопатол* 9(2): 53–60. [*Nadei OV, Ivanova TI, Sufieva DA, Agalakova NI* (2020) Morphological Changes of the Rat Hippocampal Neurons Following Excessive Fluoride Consumption. *J Anat Histopathol* 9(2): 53–60. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2020-9-2-53-60>
13. *Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM* (2024) Cell death. *Cell* 187(2): 235–256.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044>
14. *Ai Y, Meng Y, Yan B, Zhou Q, Wang X* (2024) The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death. *Mol Cell* 84(1): 170–179.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.11.040>
15. *Gupta R, Ambasta RK, Pravir Kumar* (2021) Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death? *Cell Mol Life Sci* 78(24): 8001–8047.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-04004-4>
16. *Deng Z, Zhou X, Lu JH, Yue Z* (2021) Autophagy deficiency in neurodevelopmental disorders. *Cell Biosci* 11(1): 214.
<https://doi.org/10.1186/s13578-021-00726-x>
17. *Liénard C, Pintart A, Bomont P* (2024) Neuronal autophagy: regulations and implications in health and disease. *Cells* 13(1): 103.
<https://doi.org/10.3390/cells13010103>
18. *Agalakova NI, Gusev GP* (2013) Excessive fluoride consumption leads to accelerated death of erythrocytes and anemia in rats. *Biol Trace Elem Res* 153(1–3): 340–349.
<https://doi.org/10.1007/s12011-013-9691-y>
19. *Baselt RC* (2004) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 7th ed. Biomedical Publications. Foster City, CA. 468–470.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.039271>
20. *Nadei OV, Agalakova NI* (2024) Optimal reference genes for RT-qPCR experiments in hippocampus and cortex of rats chronically exposed to excessive fluoride. *Biol Trace Elem Res* 202(1): 199–209.
<https://doi.org/10.1007/s12011-023-03646-8>
21. *King LE, Hohorst L, García-Sáez AJ* (2023) Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond. *J Cell Sci* 136(22): jcs260790.
<https://doi.org/10.1242/jcs.260790>
22. *Gong Q, Wang H, Zhou M, Zhou L, Wang R, Li Y* (2024) B-cell lymphoma-2 family proteins in the crosshairs: Small molecule inhibitors and activators for cancer therapy. *Med Res Rev* 44(2): 707–737.
<https://doi.org/10.1002/med.21999>

23. *Dixit VM* (2023) The road to death: caspases, cleavage, and pores. *Science Adv* 9(17): eadi2011. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi2011>
24. *Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK* (2023) Review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. *Mol Neurobiol* 60(10): 5805–5837. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5>
25. *Ribeiro DA, Cardoso CM, Yujra VQ, De Barros Viana M, Aguiar O Jr, Pisani LP, Oshima CT* (2017) Fluoride induces apoptosis in mammalian cells: in vitro and in vivo studies. *Anticancer Res* 37: 4767–4777. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11883>
26. *Angwa LM, Nyadanu SD, Kanyugo AM, Adampah T, Pereira G* (2023) Fluoride-induced apoptosis in non-skeletal tissues of experimental animals: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon* 9(8): e18646. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18646>
27. *Sun Y, Ke L, Zheng X, Li T, Ouyang W, Zhang Z* (2017) Effects of different levels of calcium intake on brain cell apoptosis in fluorosis rat offspring and its molecular mechanisms. *Biol Trace Elem Res* 176(2): 355–366. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0850-9>
28. *Wei N, Dong YT, Deng J, Wang Y, Qi XL, Yu WF, Xiao Y, Zhou JJ, Guan ZZ* (2018) Changed expressions of N-methyl-d-aspartate receptors in the brains of rats and primary neurons exposed to high level of fluoride. *J Trace Elem Med Biol* 45: 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.09.020>
29. *Liu YJ, Guan ZZ, Gao Q, Pei JJ* (2011) Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride – a mechanism connected with activating JNK phosphorylation. *Toxicol Lett* 204: 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.04.030>
30. *Wang C, Liang C, Ma J, Manthari RK, Niu R, Wang J, Wang J, Zhang J* (2018) Co-exposure to fluoride and sulfur dioxide on histological alteration and DNA damage in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol* 32(2). <https://doi.org/10.1002/jbt.22023>
31. *Tang Y, Zhang J, Hu Z, Xu W, Xu P, Ma Y, Xing H, Niu Q* (2023) PRKAA1 induces aberrant mitophagy in a PINK1/Parkin-dependent manner, contributing to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 255: 114772. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114772>
32. *Yan N, Liu Y, Liu S, Cao S, Wang F, Wang Z, Xi S* (2016) Fluoride-induced neuron apoptosis and expressions of inflammatory factors by activating microglia in rat brain. *Mol Neurobiol* 53: 4449–4460. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9380-2>
33. *Liao Q, Zhang R, Wang X, Nian W, Ke L, Ouyang W, Zhang Z* (2017) Effect of fluoride exposure on mRNA expression of cav1.2 and calcium signal pathway apoptosis regulators in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 54: 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.06.018>
34. *Tu W, Zhang Q, Liu Y, Han L, Wang Q, Chen P, Zhang S, Wang A, Zhou X* (2018) Fluoride induces apoptosis via inhibiting SIRT1 activity to activate mitochondrial p53 pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 347: 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.030>
35. *Chen J, Rodriguez AS, Morales MA, Fang X* (2023) Autophagy modulation and its implications on glioblastoma treatment. *Curr Issues Mol Biol* 45(11): 8687–8703. <https://doi.org/10.3390/cimb45110546>
36. *Menon MB, Dhamija S* (2018) Beclin 1 Phosphorylation – at the center of autophagy regulation. *Front Cell Dev Biol* 6: 137. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137>
37. *Rong Z, Zheng K, Chen J, Jin X* (2022) Function and regulation of ULK1: From physiology to pathology. *Gene* 840: 146772. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146772>
38. *Prerna K, Dubey VK* (2022) Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: new understanding. *Int J Biol Macromol* 204: 258–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.005>
39. *Niu Q, Chen J, Xia T, Li P, Zhou G, Xu C, Zhao Q, Dong L, Zhang S, Wang A* (2018) Excessive ER stress and the resulting autophagic flux dysfunction contribute to fluoride-induced neurotoxicity. *Environ Pollut* 233: 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.015>

40. Han X, Tang Y, Zhang Y, Zhang J, Hu Z, Xu W, Xu S, Niu Q (2022) Impaired V-ATPase leads to increased lysosomal pH, results in disrupted lysosomal degradation and autophagic flux blockage, contributes to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 236: 113500. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113500>
41. Zhang L, Hu Z, Li Z, Lin Y (2024) Crosstalk among mitophagy, pyroptosis, ferroptosis, and necroptosis in central nervous system injuries. *Neural Regen Res* 19(8): 1660–1670. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.389361>

Expression of Apoptosis, Autophagy and Necroptosis Effectors in Cells of Rat Hippocampus after Excessive F⁻ Consumption

O. V. Nadei^a, and N. I. Agalakova^{a, *}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

**e-mail: nagalak@mail.ru*

The work examined the expression of apoptosis, autophagy and necroptosis markers in hippocampal cells of rats after long-term consumption of excessive F⁻ doses at the transcriptional and translational levels. Male Wistar rats were divided into 4 groups receiving 0.4 (control), 5, 20 and 50 mg/l F⁻ (as NaF) for 12 months. The changes in contents of effectors of mitochondrial (Bcl-2, Bax, Caspase-9, Caspase-3) and receptor (Caspase-8, Fas) pathways of apoptosis, mediators (Ulk-1, Beclin-1) and modulators (AMPK, Ark, mTOR) of autophagy, as well as that of necroptosis (RIP and MLKL) were assessed by immunoblotting, the gene expression (*Bcl2*, *Bax*, *Casp3*, *Ulk1*, *Beclin1*, *Prkaa1*, *Akt*, and *mTor*) – by real-time PCR. In the hippocampus of F⁻-exposed animals, the expression ratio of *Bcl2/Bax* genes and Bcl-2/Bax proteins decreased, caspase-9 and caspase-3 were activated, but the level of caspase-8 and membrane Fas receptor remained stable. Long-term F⁻ consumption had no effect on the content of autophagy initiator Ulk-1 and protein kinases AMPK, Akt and mTOR, but resulted in inhibition of key autophagy mediator Beclin-1. The expression level of necroptosis RIP and MLKL effectors in the hippocampal cells of rats received excessive F⁻ did not change as well. Thus, long-term F⁻ exposure was accompanied by activation of apoptosis, mainly through the mitochondrial pathway, at the background of autophagy suppression.

Key words: rat, hippocampus, fluoride ions, apoptosis, autophagy, necroptosis