



УДК: 612.419.577.171.6: 577.15

ВЛИЯНИЕ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫС *IN VITRO*

**Е. М. КЛИМОЧКИНА
Н.А. СУХОСТАВСКАЯ**

*ГУ «Луганский национальный
университет имени
Тараса Шевченко»,
Украина*

e-mail: klimochkina.am@gmail.com

Целью исследования была оценка пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток при различном состоянии опиатных рецепторов. В эксперимент были взяты культуры мезенхимальных стволовых клеток крыс, в качестве агонистов опиатных рецепторов были использованы даларгин и DAGO, в качестве блокатора – налоксон. Была получена зависимость состояния пролиферативной активности от типа активированных рецептов, связанная с временем культивирования клеток. Причем, как предварительная блокада рецепторов, так и применение на ее фоне дексаметазона, вызывала повышение пролиферативной активности относительно контроля во всех опытных группах, не зависимо от вида рецепторов, хотя их дополнительная неселективная стимуляция замедляла темпы роста клеток к концу эксперимента.

Ключевые слова: опиатные рецепторы, мезенхимальные стволовые клетки, митохондриальные дегидрогеназы, пролиферация.

В последние годы исследователи уделяют огромное внимание использованию стволовых клеток для лечения различных патологий [1]. Причем, наиболее перспективным является использование мезенхимальных стволовых клеток самого пациента. Как известно, мезенхимальные стволовые клетки, источником которых является костный мозг, мультипотентны, т.е. способны дифференцироваться в клетки костной, хрящевой, мышечной тканей, а также в теноциты и элементы стромы, поддерживающие гемопоэз и нейральные клетки [2, 3, 4]. Они вырабатывают некоторые гемопоэтические и негемопоэтические ростовые факторы, интерлейкины и хемокины. Подобно гемопоэтическим, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) составляют небольшую часть клеток костного мозга, однако в определенных условиях при культивировании *in vitro* они активно пролиферируют, не вступая в дифференцировку [5]. Это дает возможность изучить влияние различных факторов и веществ на процессы роста, дифференцировки и гибели данных клеток, а также особенности их метаболизма. На сегодняшнем этапе исследователей интересует вопрос миграции МСК из костного мозга в поврежденные органы и ткани с последующим размножением и дифференцировкой, механизмы этих процессов, а также роль факторов модулирующих взаимоотношения пролиферации, дифференцировки и апоптоза при адаптации трансплантируемых МСК [6, 7]. Особое значение имеют исследования, связанные с углублением понимания молекулярных механизмов регуляции апоптоза и пролиферации, а также возможности использования их ингибирования или активации в лечении целого ряда заболеваний [8, 9].

При этом особый интерес вызывает влияние на пролиферативную активность клеток состояния опиатных рецепторов. Опиоидная система представляет собой обширную и разнообразную по своему влиянию на организм регуляторную систему. Она участвует в регуляции различных физиологических функций, в том числе сердечно-сосудистой системы, в модуляции боли, пролиферации и других [10, 11]. Некоторые исследователи показали важную роль состояния опиатных рецепторов в процессах пролиферации при некоторых видах рака, включая рак яичников, а также при нейрогенезе и нейропротекции [12, 13, 14]. Но для выявления основных механизмов влияния опиоидной системы в процессах пролиферации, дифференцировки и апоптоза необходимы дальнейшие исследования.

Связь работы с научными программами, темами: работа выполнялась в рамках научной программы Министерства образования и науки Украины «Исследование процессов пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток и их влияние на регенерацию тканей» (номер государственной регистрации 0111U002247).

Целью исследования была оценка пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток при различном состоянии опиатных рецепторов.



Материалы и методы.

Для исследования брали клетки костного мозга путем промывания полости бедренной кости взрослых лабораторных крыс. Клетки культивировали в среде Игла МЭМ с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков в течение 14 дней со сменой питательной среды один раз в неделю. Жизнеспособность клеток в культуре определяли по тесту с трипановым синим. В эксперимент было взято 9 опытных групп: в первой серии групп клетки культивировали с неселективным агонистом опиатных рецепторов даларгином, с селективным агонистом μ -опиатных рецепторов DAGO, с дексаметазоном, с даларгином и дексаметазоном, DAGO с дексаметазоном. Во второй серии эксперимента блокировались опиатные рецепторы с помощью налоксона, а также добавляли к налоксону дексаметазон, даларгин и DAGO. Клетки с препаратами культивировали 24 и 48 часов. Контролем служила интактная культура клеток.

Для определения уровня клеточной пролиферации нами был использован колориметрический метод, основанный на том, что дегидрогеназы митохондрий в жизнеспособных клетках, в которых высокая метаболическая активность, способны превращать добавленную в культуру водорастворимую МТТ-тетразолиевую соль желтого цвета в кристаллы нерастворимого в воде формазана лилового цвета [15]. За 100% принимали количество формазана, образовавшегося в аликвоте свежесыводенных клеток костного мозга. Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере Celeron 300A с применением стандартных пакетов прикладных программ [16].

Результаты и обсуждение.

Принимая за 100% количество восстановленного формазана в растущей культуре клеток, без применения каких-либо препаратов, мы получили достаточно стабильные показатели пролиферативной активности в контрольной группе в течение всего времени культивирования (рис. 1).

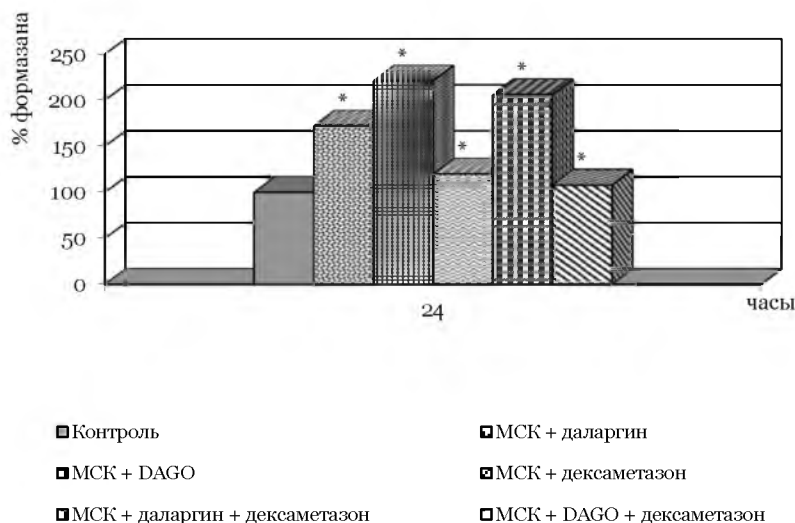


Рис. 1. Количество формазана в культуре МСК при действии агонистов опиатных рецепторов(24 часа культивирования, %), *- $p < 0,05$, различия показателей достоверны по сравнению с контролем

При культивировании МСК с неселективным стимулятором опиатных рецепторов даларгином проходило значительное достоверное увеличение пролиферативной активности клеток в течение всего срока культивирования, которое достигало максимальной величины ко вторым суткам и превосходило контроль в 2,6 раза ($p < 0,05$). В то время как использование селективного агониста μ -опиатных рецепторов в начале эксперимента приводило к увеличению уровня формазана в 2,21 раза ($p < 0,05$), а к концу опыта резко понижалось в пределах опытной группы и практически не отличалось от контроля (рис. 1, рис. 2).

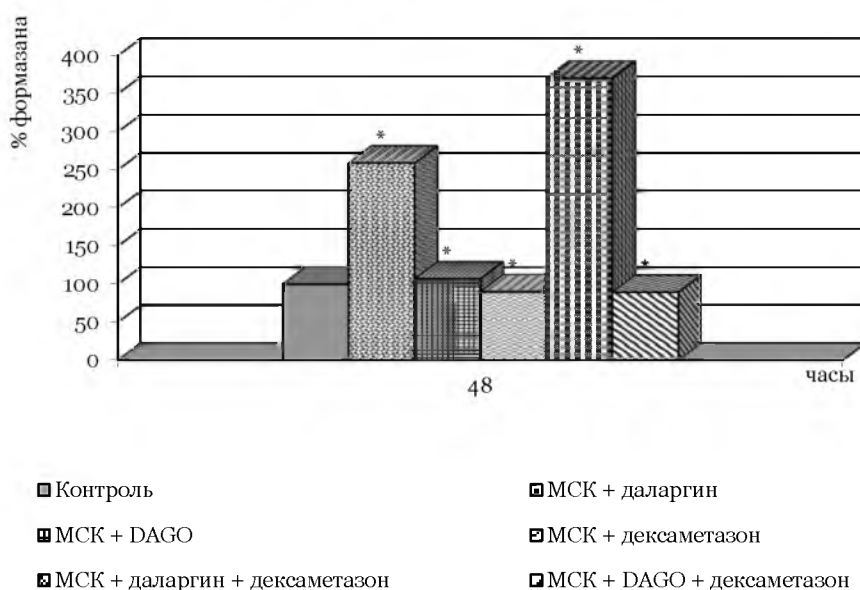


Рис. 2. Количество формазана в культуре MCK при действии агонистов опиатных рецепторов (48 часов культивирования, в %), *- $p < 0,05$, различия показателей достоверны по сравнению с контролем

При анализе пролиферативной активности клеток нельзя обойти один из важнейших факторов роста клеточных культур – глюкокортикоидные гормоны, их действие на клетки в различных условиях культивирования. Они могут стимулировать или подавлять пролиферацию в культуре в зависимости от типа клеток и плотности их роста, а также изменять их чувствительность по отношению к другим факторам роста. Глюкокортикоиды, относящиеся к липофильным гормонам, проходят плазматическую мембрану клетки пассивно и затем связываются с внутриклеточными рецепторами с образованием гормон-рецепторного комплекса. Данный комплекс, в свою очередь, взаимодействует со специфическими областями ДНК и активирует или инактивирует специфические гены. Связывание гормона с рецептором приводит к изменениям физико-химических свойств последнего, причем на эти процессы может влиять температурный режим культивирования, наличие АТФ и других компонентов в питательной среде. Рецепторы глюкокортикоидных гормонов отличаются высокой специфичностью и имеют достаточно сложное строение. Наряду с этим имеются данные, что стероиды вначале связываются специфическими белками мембраны клетки, которые транспортируют их к цитоплазматическому рецептору или, минуя его, непосредственно к рецепторам ядра [17]. Эффект действия стероидных гормонов проявляется не сразу, а спустя определенное время, которое необходимо для образования РНК и последующего синтеза специфического белка. При анализе пролиферативной активности культуры при действии дексаметазона учитывалась также его способность вызывать прикрепление клеток, а также индуцировать клеточную дифференцировку, причем направленность дифференцировки определяется сочетанием вводимых в состав полной питательной среды препаратов [18, 19]. При добавлении к клеткам дексаметазона в начале культивирования произошло небольшое увеличение активности клеток, которое с течением времени уменьшалось и было ниже контроля. В условиях сочетанного действия дексаметазона и даларгина пролиферативная активность в первые сутки превосходила контроль и даже продолжала расти ко вторым (в 3,7 раза выше контроля), а также превышала значения группы даларгина, хотя и сохраняла ее тенденцию (рис. 2). Тогда как применение в этих же условиях DAGO меняло картину в противоположную сторону в сравнении с группой MCK + DAGO. Сочетание DAGO и дексаметазона в начале эксперимента практически не изменяло уровень формазана, но с течением времени количество формазана уменьшалось и было ниже контрольных значений.

Интересная картина наблюдалась при действии на культуру клеток налоксона. Блокада опиатных рецепторов налоксоном приводила в первые сутки к незначительному увеличению пролиферативной активности клеток по отношению к контролю и составила 137% (рис. 3), но с течением времени шло нарастание показателя, которое к концу составило 186% ($p < 0,05$). При первичной блокаде опиатных рецепторов и последующем добавлении даларгина, в первые сутки резко увеличивалась активность митохондриальных дегидрогеназ, превышая как контрольные значения в 2,8 раза ($p < 0,05$), так и значения групп даларгина и налоксона. Однако на вто-



рые сутки наблюдалось замедление пролиферативных процессов и концу эксперимента составило 188,3% ($p < 0,05$), что превышало контроль, но было достоверно ниже значений группы даларгина.

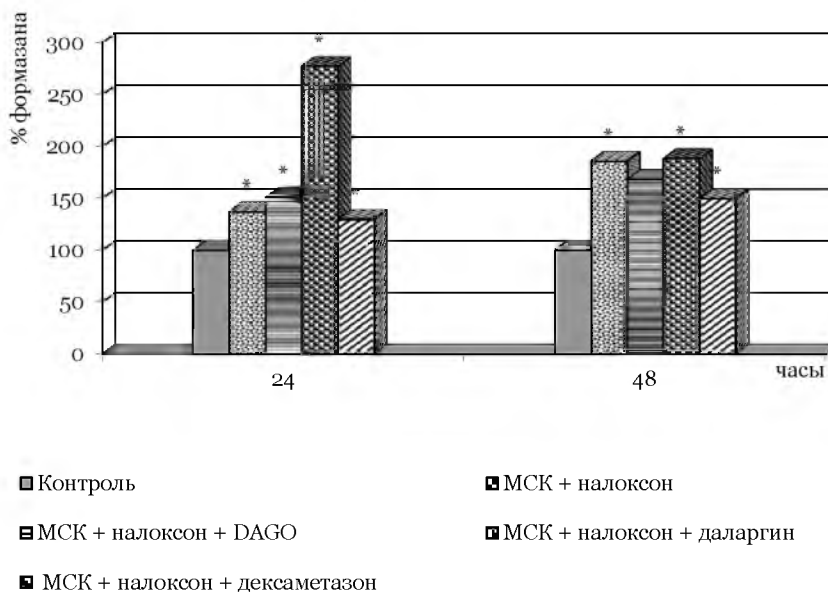


Рис.3. Количество формазана в культуре МСК при действии блокаторов опиатных рецепторов (%), *- $p < 0,05$, различия показателей достоверны по сравнению с контролем

В группе сочетанного действия налоксона и DAGO действие последнего сдерживало активирующее влияние на пролиферативную активность клеток налоксона (Рис. 3). Рост наблюдался по отношению к контролю, но не достигал значений группы налоксона. При действии дексаметазона на фоне блокады опиатных рецепторов количество формазана нарастало в течение всего эксперимента и составило на вторые сутки 149,9% ($p < 0,05$), что является самым низким показателем из всех опытных групп данной серии.

Полученные данные позволяют предположить зависимость пролиферативной активности клеток от типа активированных опиатных рецепторов, причем как на фоне блокады, так и в условиях применения дексаметазона.

Таким образом, оценивая влияние на пролиферативную активность МСК агонистов опиатных рецепторов, была получена зависимость ее состояния от типа активированных рецепторов, зависящая от времени культивирования клеток. Причем, как предварительная блокада рецепторов, так и применение на ее фоне дексаметазона вызывало повышение пролиферативной активности относительно контроля во всех опытных группах, не зависящей от вида рецепторов, хотя их дополнительная неселективная стимуляция замедляла темпы роста клеток к концу эксперимента.

Выводы.

Неселективная активация опиатных рецепторов приводит к стимуляции пролиферативной активности клеток в первые сутки эксперимента, которое нарастает к концу эксперимента. Тогда как селективное стимулирование μ -опиатные рецепторы дает резкое повышение в первые сутки и плавное, с течением времени, снижение пролиферативной способности клеток. Предварительная блокада опиатных рецепторов с течением времени изменяет на противоположное влияние как селективных, так и неселективных их агонистов на пролиферативную активность клеток.

Литература

1. Кухарчук, А.Л. Стволовые клетки и регенеративно-пластическая медицина / А.Л. Кухарчук// Трансплантология. – 2004. – № 3. – С.76-86.
2. Мальцев, В.В. Современные представления о биологии стволовой клетки/ В.В. Мальцев., И.М.Богданова // Архив патологии. – 2002. – №4. – С. 7-11.
3. Chamberlain, G. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing / G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, № 11. – P. 2739-2749.



4. Muller, I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells / I. Muller, C. Holzwarth, M. Vaegler // *BMC Cell Biol.* – 2010. – P. 11.
5. Prockop, D.J. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells / D.J. Prockop, I. Sekiya, D.C. Colter // *Cytotherapy.* – 2001. – Vol. 3. – P. 393-396.
6. Mabuchi, Y. Discovering the true identity and function of Mesenchymal Stem Cells / Y. Mabuchi, D.D. Houlihan, H. Okano, Y. Matsuzaki // *Inflammation and Regeneration.* – 2012, Vol. 32. – P. 146-151.
7. Keating, Ar. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions / Ar. Keating // *Stem Cell.* – 1012. – Vol. 10. – P. 709-716.
8. Wei-li, F.U. Proliferation and apoptosis property of mesenchymal stem cells derived from peripheral blood under the culture conditions of hypoxia and serum deprivation / J.I.A. Zhu-qing, WANG Wei-ping // *Chinese Medical Journal.* – 2011. – Vol. 124(23). – P. 3959-3967.
9. Bergmann, A. Apoptosis, Stem Cells, and Tissue Regeneration / A. Bergmann, H. Steller // *Sci Signal.* 2010 – October 26; 3(145): re8-. doi:10.1126/scisignal. 3145re8.
10. Hauser, K.F. Opioids intrinsically inhibit the genesis of mouse cerebellar granule neuron precursors in vitro: differential impact of mu and delta receptor activation on proliferation and neurite elongation / K.F. Hauser, F.F. Houdi, C.S. Turbek // *J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 12, №4. – P. 1281-1293.
11. Narita, M. Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection / M. Narita, N. Kuzumaki, M. Miyatake // *J. Neurochem.* – 2006. Vol. 97(5). – P. 1494-505.
12. Donahue, R.N. Cell proliferation of human ovarian cancer is regulated by the opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis / R.N. Donahue, P.J. McLaughlin, I.S. Zagon // *Am.J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2009. – Vol. 296(6). – P. 1716-25.
13. Avella, D.M. The opioid growth factor-opioid growth factor receptor axis regulates cell proliferation of human hepatocellular cancer / D.M. Avella, E.T. Kimchi, R.N. Donahue // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* – 2010 Vol. 298(2). – P. 459-66.
14. Yang, L. Opioid receptor agonists reduce brain edema in stroke / L. Yang, H. Wang, K. Shah // *J. Brain Res.* – 2011. – P. 1383.
15. Лунева, А.Г. Показатели продукции интерлейкина-2 и пролиферативного ответа лимфоцитов в оценке взаимодействия иммуносупрессивных препаратов/ А.Г. Лунева // *Лабораторная диагностика.* – 2002. – №3. – С. 14-20.
16. Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич – Киев: Морион, 2000. – 320 с.
17. Балаболкин, М.И. Эндокринология: учебник [для системы последилового образования] / М.И. Балаболкин. – М.: Медицина, 1998. – 584 с.
18. Тепляшин, А.С. Перспективы использования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани в регуляции регенерации опорных тканей / А.С. Тепляшин, С.З. Шарифуллина. // *Аллергология и иммунология.* – 2006. – Т. 7, № 2. – С. 189-198.
19. Петренко, А.Ю. Стромальные клетки- предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании / А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, Н.Г. Скоробогатова // *Журнал АМН України.* – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 354-365.

INFLUENCE OF OPIOID RECEPTORS ON THE STATE OF MITOCHONDRIAL DEHYDROGENASES OF RATS MESENCHYMAL STEM CELLS IN VITRO

The aim of this study was to evaluate the proliferative activity of mesenchymal stem cells depending on the state of opiate receptors. In the experiment the culture of rats mesenchymal stem cells has been used, as an agonist of opioid receptors dalargin and DAGO, as blocker -naloxone also have been used. In an experiment the dependence of the state of proliferative activity on the type of activated receptors and on time of cell cultivation was obtained. Besides, as a preliminary locking of opiate receptors and the using on its background the dexamethasone caused an increasing of proliferative activity in regard to controls in all experimental groups, independently on the type of receptors; albeit the additional non-selective stimulation has been retarding the cell growth by the end of the experiment.

Key words: opiate receptors, mesenchymal stem cells, mitochondrial dehydrogenase, proliferation.

E.M. KLIMOCKINA
N.A. SUKHOSTAVSKAYA

Luhansk
Taras Shevchenko
National university

e-mail: klimochkina.am@gmail.com