

## Связь апоптотических процессов в условиях селективной и неселективной активации опиатных рецепторов в культуре клеток с состоянием митохондриальных $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов

Е.М.Климочкина, Н.А.Сухоставская

Луганский национальный университет им. Тараса Шевченко, кафедра лабораторной диагностики  
Луганск, Украина

В статье приведены данные изучения роли активаторов и блокаторов  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов в развитии апоптоза мононуклеарных клеток при активации опиатных рецепторов. Рассмотрены особенности течения апоптотических процессов при действии DAGO (селективный агонист опиатных рецепторов) и даларгина (неселективный агонист опиатных рецепторов). Выявлено двоякое действие опиатных рецепторов на апоптоз: проапоптотическое и антиапоптотическое в зависимости от времени эксперимента и типа активированных рецепторов.

**Ключевые слова:**  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимые каналы, опиатные рецепторы, апоптоз, мононуклеарные клетки.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы исследователи уделяют огромное внимание изучению роли опиоидной системы организма и ее связи с различными процессами, происходящими в организме и клетке. Причем наиболее широко изучено влияние опиатных рецепторов на сердечно-сосудистую систему [4, 13, 16]. В частности, показано, что опиатные рецепторы связаны с  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимыми каналами и стимуляции  $\mu$ - и  $\delta$ -рецепторов создаются условия для появления  $K^+$ -тока и деполяризации внутренней мембраны митохондрий. Результатом снижения мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий является уменьшение входа  $Ca^{2+}$  в клетку через потенциалзависимые каналы, что обеспечивает устойчивость митохондрий к ишемическому повреждению, и, как следствие,

увеличивается резистентность кардиомиоцитов к гипоксии [4, 8, 15]. Подобные эффекты достигаются не только при использовании агонистов опиатных рецепторов, но и при применении активаторов  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов [9, 10]. При этом основными регуляторами каналов являются нуклеотиды, прежде всего АТФ, и при физиологической концентрации АТФ они находятся в закрытом состоянии. Однако функциональное состояние каналов определяется не только концентрацией различных нуклеотидов, но и их соотношением. Одним из процессов, приводящих к расходованию макроэргов, является апоптоз. Апоптоз, как известно, присутствует во всех клеточных системах, в том числе иммунной. А его механизм и нарушениям их регуляции принадлежит одно из ведущих мест в возникновении воспаления, освобождении организма хозяина от экзогенных и эндогенных патогенов, в развитии новообразований, аутоиммунных, аллергических и иммунодефицитных состояний [8, 11]. Физиологическая гибель клетки характеризуется разнообразными морфологическими и биохимическими изменениями ядра. При этом под влиянием эндонуклеаз происходит фрагментация ДНК. В ходе деградации ДНК сначала происходит образование крупных фрагментов, позднее образуются фрагменты всего в 30-50 тысяч пар оснований. Затем наступает межнуклеосомальная деградация с формированием фрагментов, содержащих 180 пар оснований [8]. Поэтому фрагментация ДНК считается биохимическим маркером апоптоза, на выявлении которой основаны современные методы его диагностики.

Целью исследования было изучение роли активаторов и блокаторов  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов в развитии апоптоза в мононуклеарных клетках здоровых доноров при активации опиатных рецепторов.

Работа выполнялась в рамках научной программы Министерства образования и науки, молодежи и спорта Украины «Исследование процессов пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток и их влияние на регенерацию тканей» (№ государственной регистрации 0111U002247).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования брали мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови здоровых доноров [2]. Культуру мононуклеарных клеток (МНК) получали из гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколла-верографина. Клетки культивировали в среде Игла МЭМ с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и антибиотиков. Клетки культивировали 24 и 48 ч. Жизнеспособность клеток в культуре определяли по тесту с трипановым синим. В эксперимент было взято 14 опытных групп: в первой группе клетки культивировали с блокатором  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов 5-гидроксидеканатом (5ГД), во второй — с селективным агонистом  $\mu$ -опиатных рецепторов DAGO ( $10^{-6}M$ ), в третью вначале вносили 5ГД, а через 5 мин. добавляли DAGO, в четвертую вносили DAGO и дексаметазон, в пятую — 5ГД и через 5 мин. дексаметазон, в шестую — к 5ГД добавляли DAGO и дексаметазон с интервалом в 5 мин., в седьмую — 5ГД и даларгин, в восьмую — 5ГД, даларгин и дексаметазон. Аналогичные опытные группы брали с активатором  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов диазоксидом (Sigma). Контролем

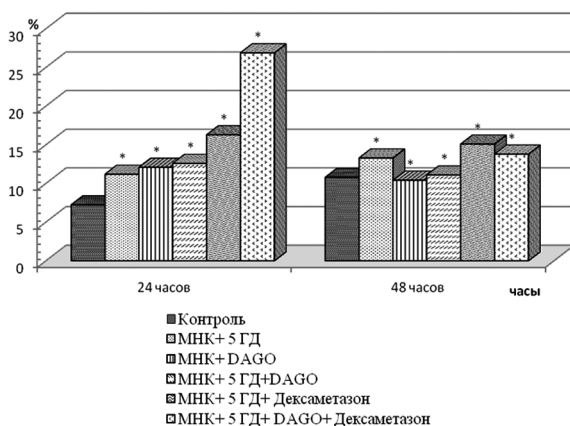


Рис. 1. Уровень фДНК при блокаде митохондриальных  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов при селективной стимуляции опиатных рецепторов (в % на  $2 \cdot 10^6$  клеток).

**Примечание:** \* — различия показателей достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

служила интактная культура мононуклеарных клеток с 24- и 48-часовой инкубацией.

Уровень фрагментации ДНК определяли с помощью дифениламинового реагента [2]. Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере Celeron 300A с применением стандартных пакетов прикладных программ [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами было получено достоверное увеличение количества фрагментированной ДНК (фДНК) при применении блокатора митохондриальных  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов, нарастающее с течением времени (рис. 1).

Активация опиатных рецепторов на фоне применения 5ГД показала интересную и разнообразную картину. Так, селективная активация  $\mu$ -опиатных рецепторов DAGO на 1-е сутки увеличила количество фДНК на 42,5% ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю и практически была равна показаниям первой опытной группы. С течением времени ее уровень несколько снижается и к концу эксперимента практически не отличается от контроля.

В то время как применение даларгина на фоне блокады каналов вначале не вызывало достоверного увеличения уровня апоптоза, тогда как к 48 ч мы наблюдаем его возрастание как в пределах опытной группы, так и по отношению к контролю на 34,7% ( $p < 0,05$ ) и на 26,5% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис. 2).

Как известно, дексаметазон стимулирует апоптоз мононуклеарных клеток и при его сочетании с 5ГД происходит увеличение количества фДНК по отношению к контролю и на 1-е и 2-е сутки, хотя в пределах опытной группы остается на постоянном уровне.

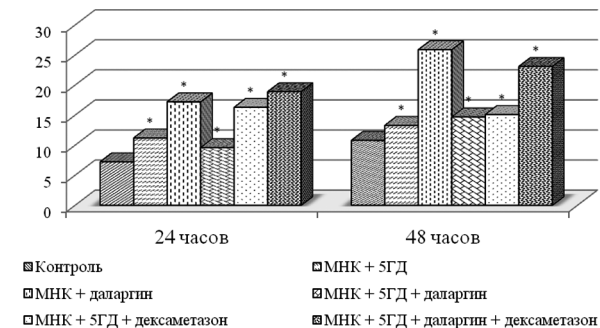


Рис. 2. Уровень фДНК при блокаде митохондриальных  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов на фоне неселективной стимуляции опиатных рецепторов (в % на  $2 \cdot 10^6$  клеток).

**Примечание:** \* — различия показателей достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

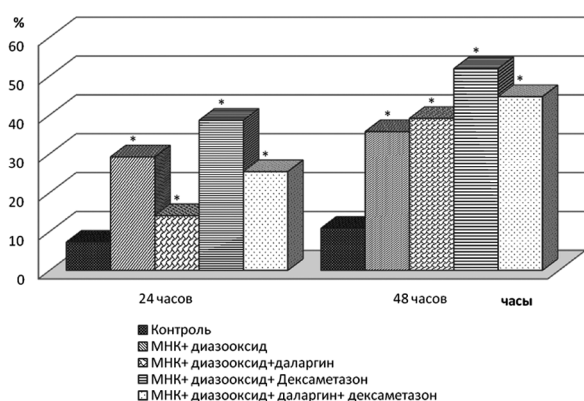


Рис. 3. Уровень фДНК при митохондриальной активации  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов диазоксидом на фоне неселективной стимуляции опиатных рецепторов (в % на  $2 \cdot 10^6$  клеток).

**Примечание:** \* – различия показателей достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

не (рис. 1). Однако необходимо отметить, что данное увеличение не достигает тех больших значений, которые наблюдаются при использовании только дексаметазона [2].

В условиях гормонозависимого апоптоза блокада каналов с одновременной селективной стимуляцией опиатных рецепторов приводит к резкому увеличению на 1-е сутки фрагментированной ДНК на 73,1% ( $p < 0,05$ ) по отношению контроля. Но с течением времени ее содержание снижается и становится ниже контрольного уровня на 22,4% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). В то время как применение даларгина в этих же условиях вызывает скачок апоптоза к концу 2-х суток на 18,1% в пределах группы и на 53,3% по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Таким образом, при полном анализе наших опытных групп мы наблюдали различную во времени двойную роль опиатных рецепторов при блокаде митохондриальных  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов, зависящую от того, какие рецепторы активированы на данный момент эксперимента.

При применении активатора митохондриальных  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов (диазоксид) показатели апоптоза были выше во всех опытных группах по сравнению с аналогичными группами, но при блокаде каналов (рис. 3, 4).

В первой опытной группе на начало эксперимента количество фДНК на 75,5% ( $p < 0,05$ ) больше, чем в контроле, а в конце – на 69,7% ( $p < 0,05$ ).

Наиболее низкий уровень увеличения фДНК по сравнению с контрольной группой мы наблюдали в группе диазоксид + даларгин – на 42,1% ( $p < 0,05$ ), и даже дополнительная стимуляция апоптоза не привела к резкому скачку в сравнении с другими группами (рис. 3). Но на 2-е сутки мы уже имели активацию апоп-

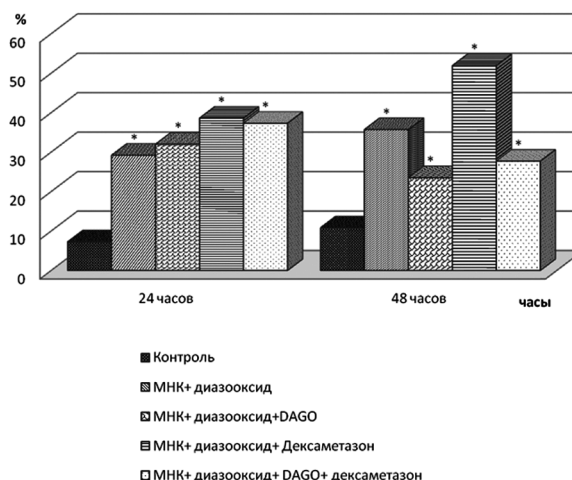


Рис. 4. Уровень фДНК при митохондриальной активации  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов диазоксидом на фоне селективной стимуляции опиатных рецепторов (в % на  $2 \cdot 10^6$  клеток).

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$ , различия показателей достоверны по сравнению с контролем.

тоза в этих группах на 72,4% ( $p < 0,05$ ) и 75,8% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Таким образом, мы можем говорить об антиапоптотическом действии даларгина на 1-е сутки, которое ослабевает с течением времени.

Другие тенденции мы имели при селективной активации рецепторов в условиях активации митохондриальных каналов (рис. 4).

Так, на 1-е сутки происходило усиление апоптотических процессов, которое с течением времени падало и превосходило контроль на 54%, меньше, чем во всех остальных опытных группах.

Из полученных данных видно, что активация митохондриальных  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов приводит к выраженной стимуляции апоптоза, в то время как их блокада дает незначительный прирост его значений. Однако как активация, так и блокада каналов приводят к тому, что уже на 1-е сутки даларгин оказывает антиапоптотическое действие, тогда как селективная стимуляция подобный эффект дает на 2-е сутки.

## ВЫВОДЫ

1. Активация митохондриальных  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов приводит к стимуляции процессов апоптоза, которая сохраняется с течением времени эксперимента.

2. Блокада митохондриальных каналов не дает существенного изменения уровня апоптоза, кроме групп гормонозависимого апоптоза в условиях стимуляции опиатных рецепторов.

3. Как активация, так и блокада митохондриальных  $K^+$ <sub>АТФ</sub>-зависимых каналов выявляют двойное действие опиатных рецепторов на



апоптоз: проапоптотическое и антиапоптотическое в зависимости от времени эксперимента и типа активированных рецепторов.

4. В дальнейшем планируется продолжить изучение связи состояния митохондриальных  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов с опиатными рецепторами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Модуляция апоптоза в почках лигандами опиатных рецепторов: роль оксида азота и  $K^+_{ATP}$ -каналов / Г.А.Дроздова, И.А.Комаревцева, Ю.А.Белоус [и соавт.] // Биомедицинская химия. — 2011. — №1.
2. Климочкина Е.М. Влияние блокатора  $K^+_{ATP}$ -зависимых каналов на содержание адениловых нуклеотидов при стимуляции  $\mu$ -опиатных рецепторов в культуре мононуклеарных клеток в условиях гормонозависимого апоптоза / Е.М.Климочкина // Украинський журнал клінічної та лабораторної медицини. — 2007. — Т.2, №4. — С. 55-59.
3. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — Киев: Моріон, 2000. — 320 с.
4. Маслов Л.Н. Роль эндогенных агонистов опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости сердца к аритмогенному действию кратковременной ишемии и реперфузии / Л.Н.Маслов, Ю.Б.Лишманов, Н.В.Нарыжная // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2005. — Т.139, №2. — С. 139-143.
5. Москалева Е.Ю. Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программированную гибель. Связь с патологией / Е.Ю.Москалева, С.Е.Северин // Патологическая физиология. — 2006. — №2. — С. 2-16.
6. Субпопуляционный состав и чувствительность к активационному апоптозу Т-лимфоцитов периферической крови на различных стадиях атерогенеза / А.А.Юдин, Л.В.Ковальчук, С.П.Григорьев [и др.] // Вестник РГМУ. — 2006. — №3. — С. 72-78.
7. Mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia / L.C.Alberici, H.C.Oliveira, B.A.Paim [et al.] // Free Radic Biol Med 2009. — Vol. 47. — P. 1432-1439.
8. Ashkenazi A. Death receptors: signaling and modulation / A.Ashkenazi, V.M.Dixit // Science. — 1998. — Vol. 281. — P. 1305-1308.
9. Activation of  $K^+$  channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells / St.Krick, O.Platoshyn, M.Sweeney [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2001. — Vol. 280. — P. 970-979.
10. The effects of ischemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration / K.H.Lim, S.A.Javadov, M. Das [et al.] // J. Physiol. — 2002. — Vol. 545 (3). — P. 961-974.
11. Maghsoudi N. Programmed cell death and apoptosis—where it come from and where it is going: from Elie Metchnikoff to the control of caspase / N.Maghsoudi, Z.Zakeri, R.A.Lockshin // Exp. Oncol. 2012. — Vol. 34 (3). — P. 146-152.
12. O'Connor O. A. Apoptosis: from biology to therapeutic targeting / O.A.O'Connor // Ann. Oncol. — 2011. — Vol. 22 (4). — P. 76-79.
13. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial  $K^+$  channels and their in cardioprotection / B.O'Rourke // Circulat. Res. — 2004. — Vol. 94. — P. 420-432.
14. Parga J.A. Effect of inhibitors of NADPH oxidase complex and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors / J.A.Parga, J.Rodryguez-Pallares, B.Joglar [et al.] // Development Dynamics. — 2010. — Vol. 239. — P. 3247-3259.
15. Superoxide flashes: early mitochondrial signals for oxidative stress-induced apoptosis / Qi Ma, Huaqiang Fang, Wei Shang [et al.] // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 5 (286). — P. 27573-27581.
16. Yamazaki D. Contribution of Kir2 potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstructed HEK293 cell model / D.Yamazaki, H.Kito, S.Yamamoto [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2011. — Vol. 300. — P. 75-86.

**О.М.Клімочкина, Н.О.Сухоставська.**

**Зв'язок апоптотичних процесів в умовах селективної і неселективної активації опиатних рецепторів у культурі клітин зі станом митохондриальних  $K^+_{ATP}$ -залежних каналів. Луганськ, Україна.**

**Ключові слова:**  $K^+_{ATP}$ -залежні канали, опиатні рецептори, апоптоз, мононуклеарні клітини.

У статті наведені дані вивчення ролі активаторів і блокаторів  $K^+_{ATP}$ -залежних каналів у розвитку апоптозу мононуклеарних клітин при активації опиатних рецепторів. Розглянуто особливості перебігу апоптотичних процесів при дії DAGO (селективний агоніст опиатних рецепторів) і даларгіну (неселективний агоніст опиатних рецепторів). Виявлена двояка дія опиатних рецепторів на апоптоз: проапоптотична й антиапоптотична в залежності від часу експерименту і типу активованих рецепторів.

**О.М.Klimochkina, N.A.Suhostavskaya. Relationship of apoptotic processes in a selective and non-selective activation of opioid receptors in the cell culture with the status of the mitochondrial  $K^+_{ATP}$ -dependent channels. Lugansk. Ukraine.**

**Key words:**  $K^+_{ATP}$ -dependent channels, opiate receptors, apoptosis, mononuclear cells.

The article presents data studying the role of activators and blockers of  $K^+_{ATP}$ -dependent channels in the developing of apoptosis in mononuclear cells by activation of opioid receptors. The features of apoptotic processes by the action of DAGO (selective agonist of opioid receptors) and dalargin (nonselective agonist opioid receptors) were considered. We found a double effect of opiate receptors on apoptosis: proapoptotic and antiapoptotic, depending on the time of the experiment and the type of activated receptors.

Надійшла до редакції 20.09.2012 р.