

УДК: 577.121: 612.419:616 – 092.9  
 © Клімочкіна О.М., Курскова М.С., 2012

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВМІСТУ АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ ПРИ ВПЛИВІ НА КЛІТИННУ КУЛЬТУРУ ЦЕРАМІДУ ТА СИНТЕТИЧНИХ ЛЕЙ-ЕНКЕФАЛІНІВ

Клімочкіна О. М., Курскова М. С.

*Луганський національний університет імені Тараса Шевченка*

Для реалізації різних енергозалежних функцій будь-якій клітині необхідний енергетичний обмін як основа її життєдіяльності. Як відомо, класично стан енергетичного обміну в клітині оцінюють за вмістом аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ), а також шляхом розрахунку індексу фосфорилування (ІФ), електричного заряду (ЕЗ) та енергетичного потенціалу (ЕП), зокрема, сумарна кількість аденілових нуклеотидів в клітці відображає функціональну рівновагу систем синтезу та розпаду пуринів і піримідинів. Насьогодні, енергетичний обмін досить багато вивчається при патології печінки, серцевого м'яза, стресі, старінні [1,2], але практично немає відомостей про його стан при активації опіатних рецепторів мононуклеарних клітин. Особливо привабливим є вивчення механізму дії опіоїдів на клітину без впливу гуморальної, нервової, імунної систем організму. У зв'язку з цим, ми використовували у експерименті клітинні культури. Опіатна система клітини включає опіатні рецептори, опіоїдні пептиди, а також ферменти, які здійснюють синтез і розщеплення опіоїдних пептидів. [3] Вивчено вплив стероїдних гормонів на  $\mu$ -опіатні рецептори у стані спокою та стресу [4]. Також відома роль опіоїдних агоністів  $\mu$ -[D-ala<sup>2</sup>, methe<sup>4</sup>, gly-ol<sup>5</sup>]-енкефалінів  $\mu$  k-U69, 593-опіатів у диференціюванні нейронних попередників [5].

В останні роки активну увагу привертає вивчення фосфоліпідів, зокрема сфінгомієліна і його похідних не тільки як структурних компонентів мембран, але і як регуляторів найважливіших клітинних процесів. Нові результати показують, що кераміди з різною довжиною ланцюга жирних кислот можуть грати різні функції в регуляції росту пухлин і терапії. Де ново-синтезовані C<sub>18</sub>- і C<sub>16</sub>-кераміди керамідсинтазами 1 та 6 (CerS<sub>1</sub> і CerS<sub>6</sub>) відіграють протилежну проапоптотичну роль, відповідно, в людських ракових клітинах голови та шиї. [6] У той же час стан енергетичного обміну при дії на нього С<sub>6</sub>-кераміду в умовах стимуляції опіатних рецепторів практично не вивчено.

**Метою роботи** було вивчення впливу С<sub>6</sub>-кераміду на показники енергетичного обміну в мононуклеарних клітинах здорових донорів (короткострокові культури) в умовах активації опіатних рецепторів.

Робота виконувалася в рамках наукової програми Міністерства освіти та науки, молоді та спорту України "Дослідження процесів проліферації та диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин та їх вплив на регенерацію тканин» (№ державної реєстрації 0111U002247).

**Матеріали і методи дослідження.** Для дослідження брали мононуклеарні клітини, виділені з периферичної крові здорових донорів. Культуру мононуклеарних клітин (МНК) одержували з гепа-

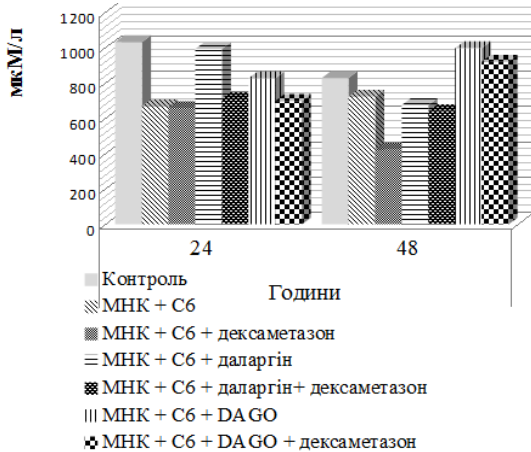
ринізованої венозної крові на градієнті щільності фіколл-верографіну [7]. Клітини культивували в середовищі Ігла МЕМ з додаванням ембріональної телячої сироватки, L - глутаміну та антибіотиків. Клітини культивували 24 і 48 годин. Життєздатність клітин у культурі визначали по тесту з трипановим синім. В експеримент були взяті 6 дослідних груп: у першій групі клітини культивували з С<sub>6</sub>-керамідом (аналогом проникного для клітини кераміду, Sigma), у другій - з С<sub>6</sub>-керамідом і дексаметазоном (Sigma). У третю спочатку вносили С<sub>6</sub>-керамід, а потім неселективний агоніст опіатних рецепторів - даларгін (синтетичний лей-енкефалінів [D-Ala<sup>2</sup>, Lue<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>]-енкефалінів, ЗАТ «БЮЛК», м. Харків), у четверту до С<sub>6</sub>-кераміду і даларгіну додавали дексаметазон. У п'ятій клітини культивували з С<sub>6</sub>-керамідом і селективним агоністом  $\mu$ -опіатних рецепторів DAGO (10<sup>-6</sup>М), в шосту - до С<sub>6</sub>-кераміду додавали DAGO і дексаметазон з інтервалом в 5 хвилин. Контролем служила інтактна культура мононуклеарних клітин з 24 і 48 годинною інкубацією. Для визначення концентрації АТФ, АДФ і АМФ використовували метод тонкошарової хроматографії на пластинках «Сілуфор» (Росія) [8]. Стан енергетичного обміну характеризували за розрахунком енергетичного потенціалу (ЕП), індексу фосфорилування (ІФ), енергетичного заряду (ЕЗ) [9]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили на персональному комп'ютері Celeron 300A із застосуванням стандартних пакетів прикладних програм [10].

**Результати та їх обговорення.** При аналізі отриманих результатів ми спостерігали зниження кількості аденілових нуклеотидів в першу добу культивування клітин з С<sub>6</sub>-керамідом. Так, вміст АТФ зменшився на 35,2%, АДФ на 35,3% і АМФ на 9% (рис. 1,2,3).

При цьому з часом вміст АТФ зростав, хоч і був достовірно нижче контрольного. Додаткове введення в культуру дексаметазону призводило до прогресуючого в часі падіння рівня АТФ в 1,96 рази по відношенню до контролю (p < 0,05) та АМФ - в 1,24 рази (p < 0,05) і відносно стабільному вмісту АДФ.

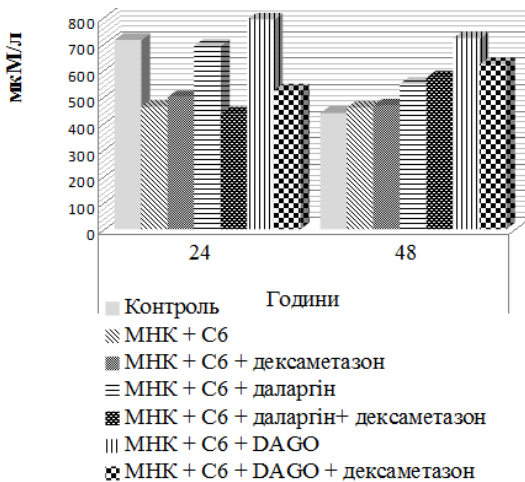
Подібна ситуація може бути пов'язана з активним протіканням в клітці енергозалежних процесів, коли розпад АТФ превалює над її синтезом, що може спостерігатися при апоптозі. А, як відомо, дексаметазон стимулює апоптотичні процеси в клітині [11]. Додаткова стимуляція опіатних рецепторів давала при подовженні терміну експерименту дуже цікаву картину, що залежить від вибіркості дії препарату. Так, при дії даларгіну, в першу добу культивування вміст АТФ достовірно не відрізнялося від контролю, а кількість АМФ пере-

вищувало контроль на 25,8%. А на другу добу відбувалося падіння рівня АТФ і АМФ (на 18,5% і на 25,4% відповідно) паралельно зі збільшенням АДФ. У той час як селективна стимуляція  $\mu$ -опіатних рецепторів DAGO на початку експерименту призводила до зниження вмісту АТФ на 20% і підвищення АДФ і АМФ. А з подовженням часу культивування синтез АТФ активізувався, і значення його перевищили контроль на 17%, з одночасним збільшенням кількості АТФ.



$p < 0,05$  відносно контролю

Рис. 1. Вплив С6 – кераміду та агоністів опіатних рецепторів на вміст АТФ (мкМ/л) в культурі МНК



$p < 0,05$ , відносно контролю

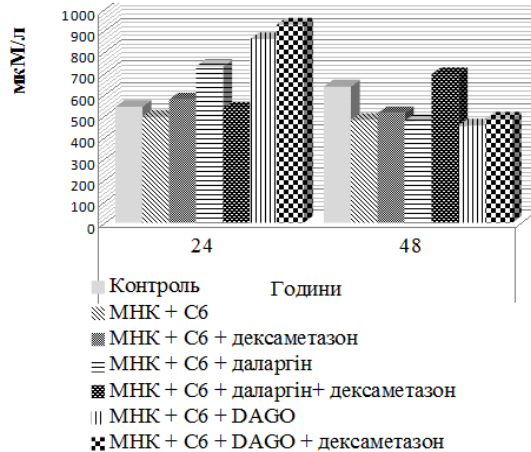
Рис. 2. Вплив С6 – кераміду та агоністів опіатних рецепторів на вміст АДФ в культурі МНК

Отримані результати в даних дослідних групах свідчать про високу енергозберігаючу активність препаратів, проте, механізм впливу на вміст аденілових нуклеотидів у них різний. Так, даларгін активує швидкі шляхи синтезу АТФ, що призводить до нівелювання дії С6 - кераміду вже в першу добу культивування, але з плином часу, його дія зменшується. Тоді як, DAGO посилює синтез АТФ тільки на другу добу, але вже в першу добу значення АТФ вище, ніж при дії одного кераміду.

При аналізі даних в групах поєднаної дії всіх трьох препаратів ми отримали в першу добу кількість АТФ у четвертій дослідній групі вище, ніж

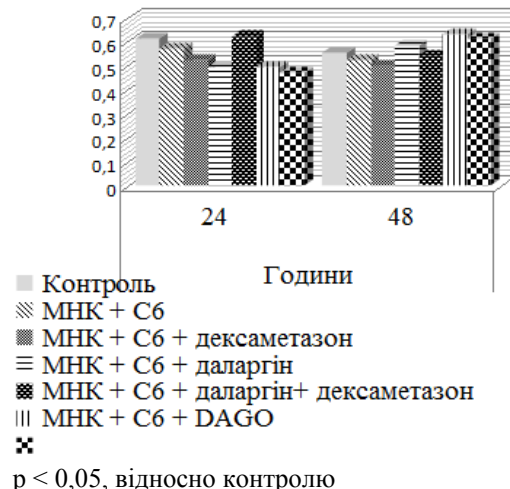
ніж при застосуванні С6 - кераміду та дексаметазону, але нижче, ніж в групі з даларгіном. Схожа картина, тільки на другу добу, спостерігається в шостій експериментальній групі.

В ході експерименту було встановлено, що величина ЕЗ в групі з С6 - керамідів не відрізняється від контрольної як в першу, так і на другу добу, також як і в четвертій групі, що говорить про здатність клітини виконувати всілякі енергозалежні процеси (Рис. 4).



$p < 0,05$ , відносно контролю

Рис. 3. Вплив С6 – кераміду та агоністів опіатних рецепторів на вміст АМФ в культурі МНК

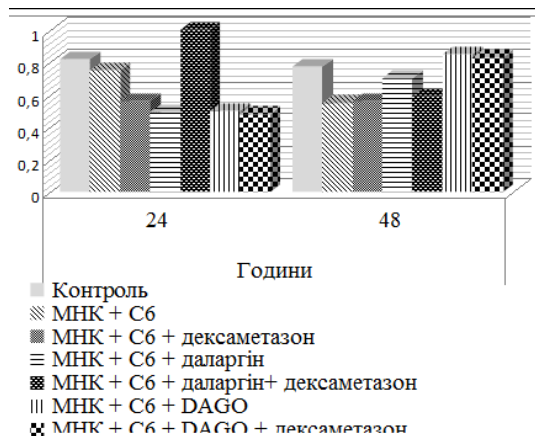


$p < 0,05$ , відносно контролю

Рис. 4. Рівень енергетичного заряду (ЕЗ) при впливі на клітини С6 - кераміду в умовах активації опіатних рецепторів

Рівень ЕЗ в інших групах був достовірно нижче на початку проведення експерименту, причому максимально низкий був в групі С6 - кераміду, DAGO і дексаметазону (на 23%), а в групах при використанні агоністів опіатних рецепторів мав однакові значення. На другу добу культивування в групі з дексаметазоном і в групі з даларгіном відбулася нормалізація значень ЕЗ, що говорить про стабілізацію співвідношення аденілових нуклеотидів. У групах з селективною активацією  $\mu$ -опіатних рецепторів значення ЕЗ були достовірно вище контролю в середньому на 12%, що говорить про активне протікання енергозалежних процесів в клітині.

Одним з показників стабільності співвідношення нуклеотидів є індекс фосфорилування (ІФ), який достовірно знижувався на першу добу у всіх дослідних групах за винятком четвертої. В цієї дослідної групі відбувалося підвищення показника на 18%, але на другу добу ми мали зниження ІФ як в межах групи, так і відносно контролю (Рис.5).



$p < 0,05$ , відносно контролю

**Рис. 5.** Рівень індексу фосфорилування (ІФ) при впливі на клітини  $C_6$  - цераміду в умовах активації опіатних рецепторів

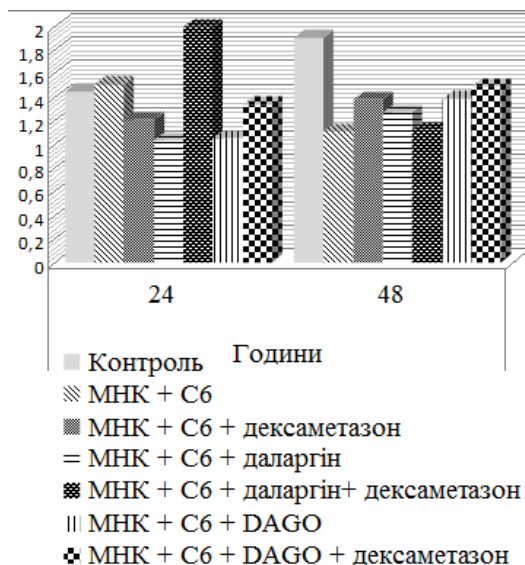
До кінця експерименту з усіх груп тільки використання DAGO призвело до активації ІФ, що дало можливість клітці з плином часу адаптуватися без напруги енергетичного обміну.

Проте стан енергетичного обміну оцінюється і за швидкістю дихання мітохондрій, на яку вказує величина енергетичного потенціалу клітини (ЕП). При впливі  $C_6$  - цераміду з плином часу відбувається падіння ЕП, що свідчить про напруженість енергетичного обміну (Рис. 6).

У разі одночасного додавання цераміду, дексаметазону і даларгіну на початку експерименту йде збільшення ЕП на 27,3%, але до кінця досвіду падає на 33%. У той час як значення ЕП в групі цераміду, дексаметазону і DAGO в першу добу знижуються, а з часом зростають. Такий стан спостерігається в клітці, коли на тлі інтенсивного споживання енергії, різко активізуються процеси синтезу АТФ.

Таким чином, отримані результати показують, що при дії на клітину  $C_6$  - цераміду в умовах активації опіатних рецепторів у клітинах з плином часу посилюються енергоємні процеси. Проте механізми дії на енергетичний обмін у даларгіну і DAGO різні. Неселективна стимуляція опіатних рецепторів даларгіном в умовах дії на клітину  $C_6$  -

цераміду призводила на першу добу до активації швидких шляхів синтезу АТФ, але з плином часу швидкість синтезу зменшувалась, що призводило до напруги енергетичного обміну. Селективна стимуляція  $\mu$  - опіатних рецепторів DAGO при одночасній дії  $C_6$  - цераміду призводила до зростання синтезу АТФ і на другу добу перевищувало контроль.



$p < 0,05$ , відносно контролю

**Рис. 6.** Рівень енергетичного потенціалу (ЕП) при впливі на клітини  $C_6$  - цераміду в умовах активації опіатних рецепторів

#### Висновки:

1. Вплив  $C_6$  - цераміду на клітину призводить до активації енергозалежних процесів, що залежать від часу культивування.
2. Неселективна стимуляція опіатних рецепторів даларгіну в умовах дії на клітину  $C_6$  - цераміду приводила на першу добу до активації швидких шляхів синтезу АТФ, але з плином часу швидкість синтезу падала, що вело до напруженості енергетичного обміну.
3. Селективна стимуляція  $\mu$  - опіатних рецепторів DAGO при одночасній дії  $C_6$  - цераміду приводила до поступового підвищення синтезу АТФ і до других діб перевищувало контроль.
4. Надалі планується продовжити вивчення впливу агоністів опіатних рецепторів на енергетичний обмін клітини з метою виявлення механізмів їх дії на клітину.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Гонський Я.І. Особливості впливу карнітину хлориду на енергетичні процеси у печінці тварин різних вікових груп за умови інтоксикації солянокислим гідразиним/ Я.І. Гонський, І.М. Кліщ, М.М. Корда // Медична хімія. – 2001. - №3. – С. 29 – 33.
2. Горішна О.В. Вплив гамма-опромінювання і нітратної інтоксикації на енергетичний метаболізм печінки залежно від віку / О.В. Горішна, Б.М. Горішний // Медична хімія. – 2000. - №3. – С. 68-69.
3. Лишманов Ю.Б. Опіатергическая регуляция состояния центральной гемодинамики / Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2003. - №1. – С. 2-11.
4. Mu and kappa opioids modulate mouse embryonic stem cell-derived neural progenitor differentiation via MAP kinases / Hahn JW, Jagwani S, Kim E et al. // J. Neurochem. – 2010. - Mar;112(6):1431-1441.
5. The influences of reproductive status and acute

stress on the levels of phosphorylated mu opioid receptor immunoreactivity in rat hippocampus / **Gonzales KL, Chapleau JD, Pierce JP et al.** // J. Front Endocrinol. (Lausanne). – 2011. – Aug 19;2(18).

6. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways/ **Senkal CE, Ponnusamy S, Bielawski J et al.** // – 2010. – Jan;24(1):296-308.

7. Оценка субпопуляций Т – лимфоцитов у человека: (метод. рекоменд.) / **А.С. Павлюк** - М., 1988. – С. 13 – 18.

8. **Зарубина И.В** Разделение и прямое количест-

венное определение адениннуклеотидов на силуфоле / **И.В. Зарубина, Б.И. Криворучко** // Укр. биохим. журнал. – 1982. – №4. – С. 437-439.

9. **Успенская Ю.А.** Модуляция доксорубицином биологических эффектов АТФ в клетках костного мозга in vitro / **Ю.А. Успенская, А.Б. Егорова В.П. Нефедов** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133. – № 5. – С.487-490.

10. **Лапач С.Н.** Статистические методы в микро-биологических исследованиях с использованием Excel // **С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич** – К.: Морион, 2000. – 320 с.

**Клімочкіна О. М., Курскова М. С.** Характеристика вмісту аденилових нуклеотидів при впливі на клітину культури цераміду та синтетичних лей-енкефалінів // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 6. – С. 75-78.

Метою роботи було вивчення впливу  $C_6$  - цераміду на показники енергетичного обміну в мононуклеарних клітинах здорових донорів (короткострокові культури) в умовах активації опіатних рецепторів. Після проведення експерименту були встановлені наступні висновки: вплив  $C_6$  - цераміду на клітину призводить до активації енергозалежних процесів, що залежать від часу культивування. Неселективна стимуляція опіатних рецепторів даларгіном в умовах дії на клітину  $C_6$  - цераміду приводила на першу добу до активації швидких шляхів синтезу АТФ, але з плином часу швидкість синтезу падала, що вело до напруженості енергетичного обміну. В той же час, селективна стимуляція  $\mu$  - опіатних рецепторів DAGO при одночасній дії  $C_6$  - цераміду приводила до поступового підвищення синтезу АТФ і на другу добу перевищувало контроль. Надалі планується продовжити вивчення впливу агоністів опіатних рецепторів на енергетичний обмін клітини з метою виявлення механізмів їх дії на клітину.

**Ключові слова:** опіатні рецептори,  $C_6$  – церамід, мононуклеарні клітини, АТФ, АДФ, АМФ.

**Климочкина Е. М., Курскова М. С.** Характеристика содержания адениловых нуклеотидов при влиянии на клетку культуры церамида и синтетических лей-энкефалинов // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 6. – С. 75-78.

Целью работы было изучение влияния  $C_6$  - церамида на показатели энергетического обмена в мононуклеарных клетках здоровых доноров (краткосрочные культуры) в условиях активации опіатных рецепторов. После проведения эксперимента были установлены следующие выводы: влияние  $C_6$  - церамида на клетку приводит к активации энергозависимых процессов, зависящих от времени культивирования. Неселективная стимуляция опіатных рецепторов даларгином в условиях действия на клетку  $C_6$  - церамида приводила в первые сутки к активации быстрых путей синтеза АТФ, но с течением времени скорость синтеза падала, что вело к напряженности энергетического обмена. В то же время, селективная стимуляция  $\mu$  - опіатных рецепторов DAGO при одновременном действии  $C_6$  - церамида приводила к постепенному повышению синтеза АТФ и на вторые сутки превышало контроль. В дальнейшем планируется продолжить изучение влияния агонистов опіатных рецепторов на энергетический обмен клетки с целью выявления механизмов их действия на клетку.

**Ключевые слова:** опіатные рецепторы,  $C_6$  - церамид, мононуклеарные клетки, АТФ, АДФ, АМФ.

**Klimochkina E. M., Kurskova M. S.** The influence of ceramides and synthetic leu-enkephalins culture on characteristics of contents adenine nucleotides in cell // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 6. – С. 75-78.

The purpose of our research is to study the effect of  $C_6$  - ceramide on parameters of energy metabolism in mononuclear cells from healthy donors (current culture) in the activation of opіoid receptors. On the basis of the conducted researches we can do the following conclusions: the impact of  $C_6$  - ceramide on the cell leads to the activation energy-dependent processes, depending on the time of cultivation. Nonselective stimulation dalargin in action on cell  $C_6$  - ceramide resulted to the activation of the fast ways to ATP synthesis in the first day, but over time, the rate of synthesis decreased, which led to tensions energy of exchange. At the same time, selective stimulation of the  $\mu$  - opіoid receptors DAGO during the simultaneous action of  $C_6$  - ceramide led to a gradual increase in the synthesis of ATP, and on the second day it was higher than control. In the future we are going to continue to study the effect of opiate receptor agonists on energy metabolism cages in order to identify the mechanisms of their action on the cell.

**Key words:** opiate receptors,  $C_6$  - ceramide, mononuclear cells, ATP, ADP, AMP.

Надійшла 19.09.2012 р.  
Рецензент: проф. І.О.Комаревцева