

УДК 57.034:577.217.5+57085.23

## ДОФАМИН ДЕЗОРГАНИЗУЕТ ПРЯМЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В КУЛЬТУРАХ КЕРАТИНОЦИТОВ; СРАВНЕНИЕ С ГЕПАТОЦИТАМИ

© 2016 г. В. Я. Бродский, Е. А. Воротеляк, В. В. Терских, А. В. Васильев, Л. А. Мальченко,  
Д. С. Конченко\*, Т. К. Дубовая\*, Н. Д. Звездина

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
119334 Москва, ул. Вавилова 26

\*Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
117997 Москва, ул. Островитянова 1

E-mail: brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 23.03.2015 г.  
Окончательный вариант получен 24.10.2015 г.

В отличие от норадреналина или мелатонина, синхронизирующих прямые межклеточные взаимодействия и организующих ритм синтеза белка, дофамин (0.4 мкг/мл) ликвидирует ритм синтеза белка в кератиноцитах NaCaT и в гепатоцитах. Опыты с блокатором D2 рецепторов дофамина метоклопрамидом (церукал, 2 мкг/мл) показали, что дезорганизующий эффект дофамина обусловлен активацией D2 рецепторов, блокирующих, по данным литературы, аденилатциклазу и выброс ионов кальция из внутренних депо. Показано, что в условиях наших опытов церукал не активирует рецепторы серотонина. Восстановление взаимодействий клеток после действия дофамина или во время его действия осуществляется мелатонином (0.001 мкг/мл). Обсуждается рекомендация инъекировать мелатонин перед введением дофамина по разным клиническим показаниям.

**Ключевые слова:** межклеточные взаимодействия, кинетика синтеза белка, кератиноциты, культуры NaCaT, гепатоциты, дофамин, рецепторы дофамина, мелатонин, церукал.

DOI: 10.7868/S0475145016020026

### ВВЕДЕНИЕ

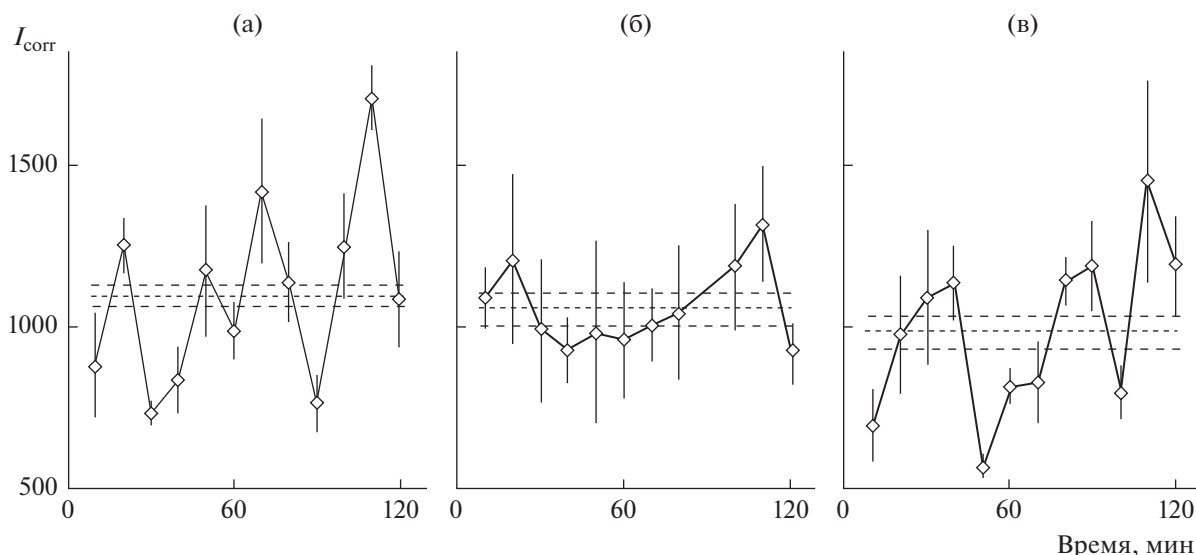
Прямые межклеточные взаимодействия регулируют кооперацию клеток в кинетике различных функций; маркер кооперации — околочасовые ритмы в клеточных культурах (обзор, Бродский, 2014). Ранее выявлены факторы организации околочасового ритма синтеза белка — внеклеточные и внутриклеточные. Установлено, что начальным сигналом на рецепторах клеточной мембраны являются ганглиозиды, норадреналин и его фармакологический аналог фенилэфрин, серотонин и его производное гормон мелатонин. Факторы-организаторы влияли на кинетику синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* и *in vivo*, в мезенхимных стромальных клетках и в культурах кератиноцитов NaCaT (см. также, Бродский и др., 2011). В последнее время показано, что в отличие от норадреналина и серотонина, их аналогов и производных, дофамин дезорганизует ритм синтеза белка в гепатоцитах (Brodsky et al., 2012). В контроле, в синхронных культурах выявляли ритм. После 5–10 мин действия 1–10 мкМ дофамина ритма не было. Задача новой работы — выяснить влияние дофамина на межклеточные взаимодействия в культурах NaCaT

кератиноцитов. Катехоламин дофамин — предшественник норадреналина и адреналина — используют в неврологической и кардиологической клинике. Известно, что дофамин влияет на пролиферацию кератиноцитов (Parrado et al., 2012), от взаимодействий которых может зависеть их миграция и дифференцировка и, следовательно, рост кожи и заживление ран. Состояние адрено- и дофаминовых рецепторов, активируемых норадреналином или дофамином и их агонистами, заслуживают внимания.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

#### *Клеточные культуры*

Нетрансформированные кератиноциты кожи человека NaCaT культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и глутамина (ПанЭКО). Клетки снимали смесью 0.25% трипсин-ЭДТА (Gibco). Пассировали раз в 3–5 дней в соотношении 1 : 4–1 : 6. Для целей наших опытов суспензию клеток переносили в бессывороточную среду; среду 199 дополняли 0.2 мг/мл альбумина



**Рис. 1.** Влияние дофамина на кинетику синтеза белка в отмытых суточных культурах NaCaT кератиноцитов: (а) контроль: кинетику синтеза белка исследовали через 70 мин инкубации культур в свежей среде; (б) кинетику исследовали через 70 мин инкубации культур в среде с дофамином (0.4 мкг/мл); (в) в среду с такими же культурами вводили мелатонин (0.001 мкг/мл) и через 5 мин дофамин (0.4 мкг/мл); через 65 мин, не меняя среду, исследовали кинетику синтеза белка. Здесь и на рис. 2 и 3 на оси абсцисс время (мин), по оси ординат —  $I_{\text{согг}}$ , включение  $^3\text{H}$ -лейцина с поправкой на пул лейцина, невключившегося в белки (см. Методы).

для клеточных культур (Sigma) и 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma); газовая фаза содержала 90% воздуха и 10%  $\text{CO}_2$ . Суспензию, содержащую  $4\text{--}5 \times 10^6$  клеток в 1 мл среды, вносили в чашку Петри с 30 мл бесывороточной среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Площадь каждого стекла примерно 1  $\text{cm}^2$ . Получали плотные культуры с близко расположенными клетками. Через сутки культуры отмывали и переносили в свежую среду.

Получение первичных культур гепатоцитов крысы детально описано ранее (Brodsky et al., 2000). Гепатоциты самцов крыс Вистар изолировали с помощью 0.5% коллагеназы и культивировали на стеклах, покрытых коллагеном, в бесывороточной среде (см. выше). Плотные культуры с близко расположенными клетками получали при введении в чашку Петри над стеклами, покрытыми коллагеном, около  $10^6$ /мл суспензии изолированных гепатоцитов. Через 2–3 ч культуры отмывали и переносили в свежую среду; через сутки культуры вновь отмывали.

В некоторых опытах D2 рецепторы дофамина блокировали метоклопрамидом (действующий компонент лекарства “церукал”, Плива Хорватска, Хорватия).

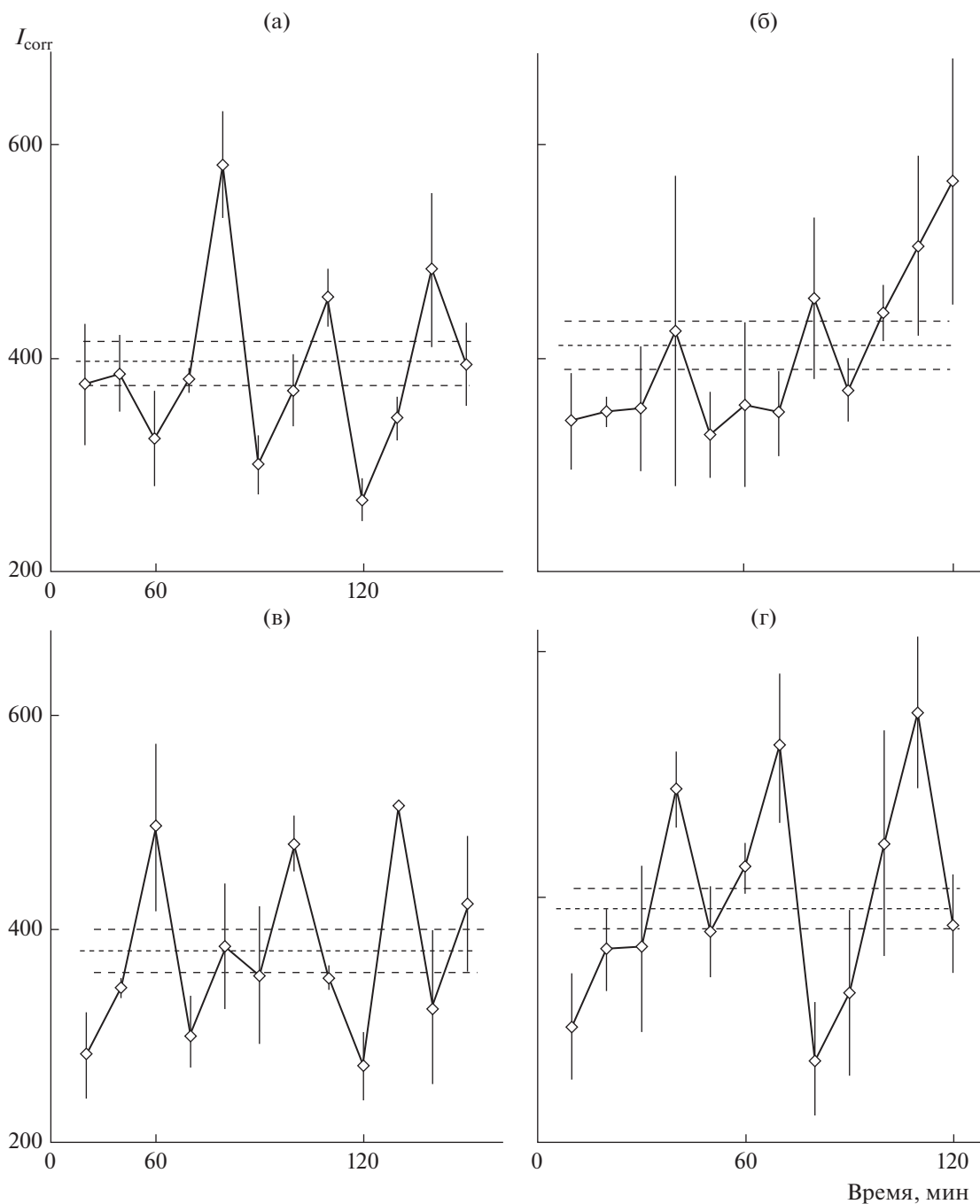
**Исследования кинетики синтеза белка** (детальнее Brodsky et al., 2000).

Пробы, по три стекла с культурами каждая, брали последовательно через 10 мин в течение 2 ч. Каждую пробу инкубировали отдельно в течение 10 мин при  $37^\circ\text{C}$  в среде с  $^3\text{H}$ -лейцином (25–

30  $\mu\text{Ci}/\text{мл}$ , специфическая радиоактивность 70–100  $\text{Ci}/\text{ммоль}$ ). Культуры промывали холодным физиологическим раствором с избытком немеченого лейцина и для экстракции невключившегося в белки лейцина переносили в холодную 5% хлорную кислоту на 60 мин. Затем культуры промывали этиловым спиртом, и белки растворяли гиаминном (бензетониум гидроксид, Sigma). Радиоактивность лейцина в белках и в небелковой кислоторастворимой фракции измеряли в каждой культуре, используя сцинтилляционный счетчик Perkin Elmer Tri-Carb 2810 OTR (США). Рассчитывали относительное включение лейцина  $I_{\text{согг}}$  в белки с поправкой на пул свободного лейцина  $I_{\text{согг}} = I_i P_m / P_i$  (срт), где  $I_i$  – измеренное включение в определенной культуре, а  $P_i = I_i + p_i$  – общая радиоактивность клеток культуры,  $p_i$  – радиоактивность свободного (не включившегося в белки)  $^3\text{H}$ -лейцина в той же культуре,  $P_m$  – средняя радиоактивность всех культур данного опыта. В отношении  $I_{\text{согг}}$  нивелируются варибельность пула свободного лейцина, а также различное число клеток в разных культурах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведен пример определения действия дофамина на культуры кератиноцитов NaCaT. В контроле (рис. 1а), в нативных суточных культурах наблюдали выраженный ритм синтеза белка с двумя периодами в течение 2 ч наблюдений. Обработка таких же культур дофамином

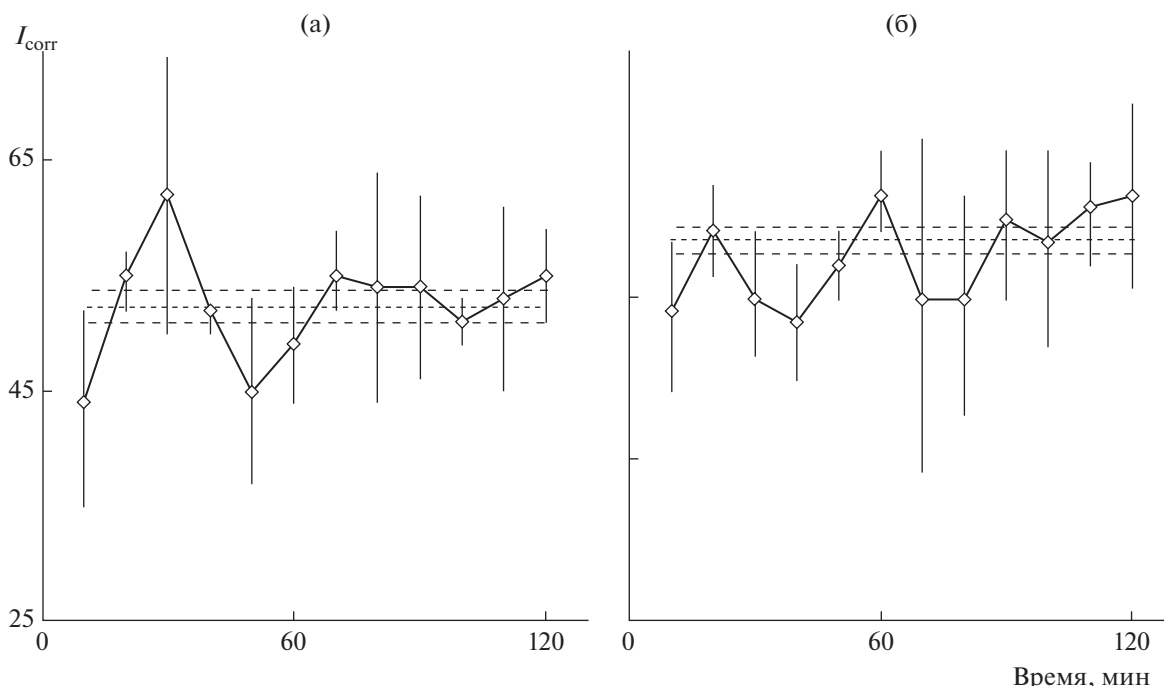


**Рис. 2.** Влияние дофамина и блокатора D2 рецепторов дофамина метоклопрамида (церукала) на кинетику синтеза белка в плотных отмытых суточных культурах гепатоцитов крысы: (а) контроль: кинетику синтеза белка исследовали через 70 мин инкубации культур в свежей среде; (б) кинетику исследовали через 70 мин инкубации культур в среде с дофамином (0.4 мкг/мл); (в) кинетику исследовали через 70 мин инкубации культур в среде с церукалом (2 мкг/мл); (г) в среде с культурами вводили церукал (2 мкг/мл) и через 5 мин дофамин (0.4 мкг/мл); через 65 мин исследовали кинетику синтеза белка.

(0.4 мкг/мл) привела к ликвидации ритма (рис. 16). В течение 2 ч все пробы, кроме последней, достоверно не отличались друг от друга; все 12 проб входили в пределы вариабельности средней для всего опыта (36 культур)  $\pm$  ошибка этой средней. Если в среду с культурами ввести мелатонин

(0.0012 мкг/мл) и затем дофамин, дезорганизующее действие дофамина блокируется (рис. 1г). В этом случае наблюдали ритм синтеза белка.

Различают пять типов рецепторов дофамина. По способности организовывать кинетику синтеза белка эти рецепторы можно разделить на две

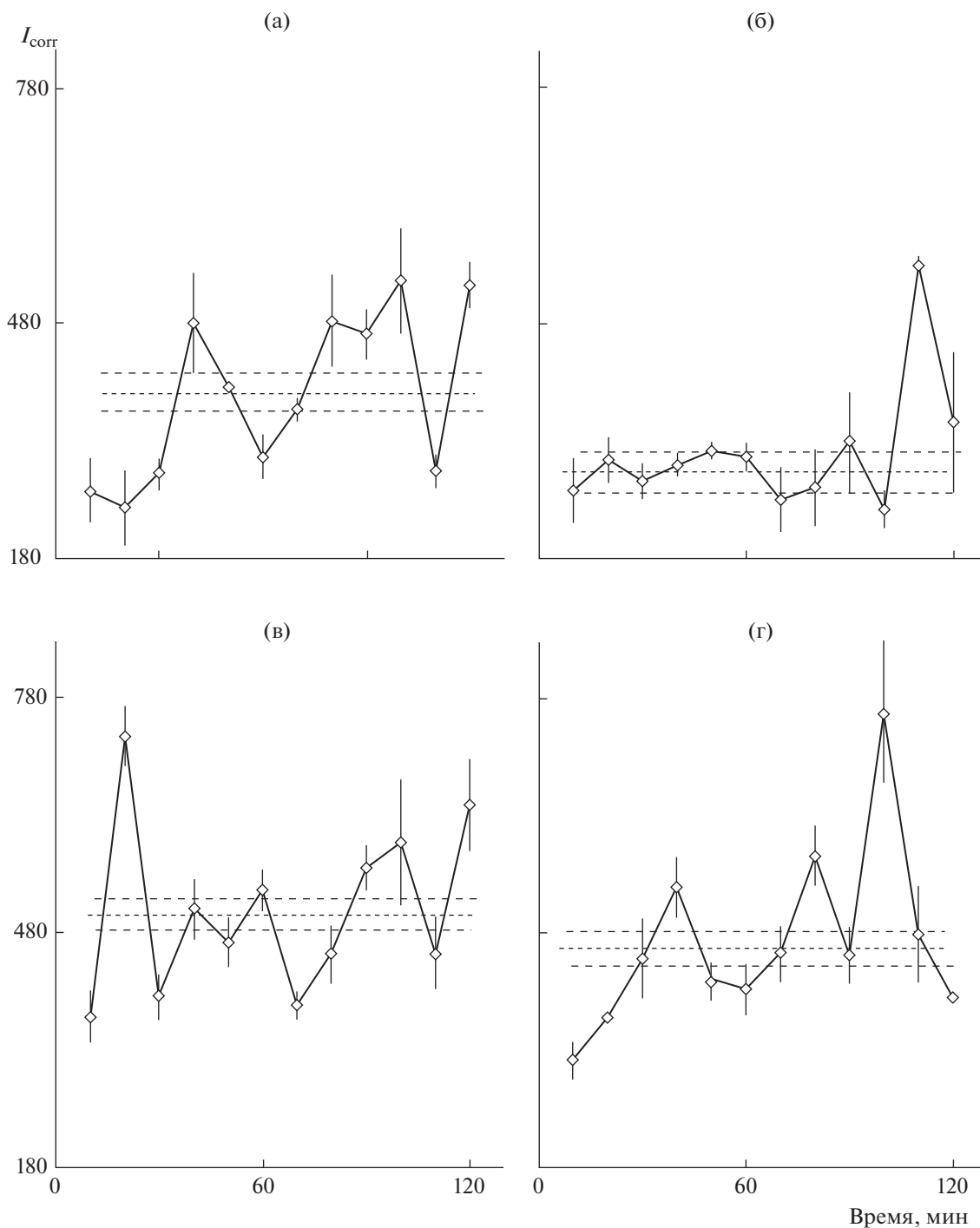


**Рис. 3.** Влияние церукала на кинетику синтеза белка в разреженных отмытых суточных культурах гепатоцитов крысы: (а) контроль: кинетику синтеза белка исследовали при инкубации культур в свежей среде; (б) кинетику исследовали при инкубации таких же культур в среде с церукалом (2 мкг/мл).

группы. D1 рецепторы активируют аденилатциклазу и стимулируют выброс кальция из внутренних депо (Beaulieu, Gainetdinov, 2011; Parado et al., 2012); вследствие этого повышается активность протеинкиназ. Согласно нашим данным, активация протеинкиназ (преимущественно протеинкиназ C и A) – ключевое звено кооперации клеток в организации ритма синтеза белка (обзор Бродский, 2014). Стимуляция D1 рецепторов дофамина приведет к организации ритма, также как сигнал от норадреналина или мелатонина. Противоположным должен быть эффект D2 рецепторов дофамина, активация которых тормозит активность аденилатциклазы и внутриклеточный транспорт кальция.

Ликвидация ритма синтеза белка в гепатоцитах при действии на них дофамина может определяться его влиянием на D2 рецепторы. На рис. 2 приведено влияние на кинетику синтеза белка антагониста D2 рецепторов дофамина метоклопрамида – действующего компонента известного лекарства церукал. В контроле, в плотных культурах гепатоцитов, как во многих предыдущих наших работах, наблюдали ритм синтеза белка (рис. 2а). Дофамин в дозе (0.4 мкг/мл), как это показано нами и ранее (Brodsky et al., 2012), ликвидировал ритм (рис. 2б). В течение 2 ч наблюдений культур в среде с дофамином 10 проб из 12 достоверно не отличались друг от друга; 10 проб были в пределах средней для всего опыта  $\pm$  ошибка этой средней.

Сам церукал в дозе 2 мкг/мл не влиял на ритм (рис. 2в). При блокировании D2 рецепторов церукалом в среде с дофамином в гепатоцитах сохранялся ритм синтеза белка (рис. 2г). Трактовка данных рис. 2 затруднена наблюдением неоднозначного действия метоклопрамида. В некоторых случаях метоклопрамид не только блокирует D2 рецепторы дофамина, но одновременно активирует рецепторы серотонина, стимулирующие аденилатциклазу и, таким образом, организующие ритм синтеза белка. Так, например, действовал метоклопрамид на клетки феохромоцитомы (Guillemot et al., 2005). Если такое происходит и в гепатоцитах, эффект метоклопрамида (церукала) вместе с дофамином можно объяснить купированием эффекта дофамина активацией серотониновых рецепторов. Данные рис. 3 снимают возможность активации церукалом рецепторов серотонина в гепатоцитах. Используются разреженные несинхронные культуры гепатоцитов, в которых нет ритма синтеза белка (обзор Бродский, 2014). Ритм в таких культурах организуется внешним синхронизатором – мелатонином, норадреналином, серотонином и др. и, следовательно, если бы церукал активировал рецепторы серотонина, мы наблюдали бы ритм. И без церукала (контроль, рис. 3а) и в среде с церукалом (рис. 3б) все точки кривых кинетики синтеза белка достоверно не отличаются друг от друга и входят в пределы средней для всего опыта  $\pm$  ошибка этой средней.



**Рис. 4.** Влияние дофамина, мелатонина и церукала на кинетику синтеза белка в кератиноцитах HaCaT: (а) контроль: кинетику синтеза белка исследовали через 70 мин инкубации культур в свежей среде; (б) кинетику исследовали через 70 мин инкубации культур в среде с дофамином (0.4 мкг/мл); (в) в среду с культурами вводили мелатонин (0.001 мкг/мл) и через 5 мин дофамин; через 65 мин исследовали кинетику синтеза белка; (г) в среду с культурами вводили церукал (2 мкг/мл) и через 5 мин дофамин (0.4 мкг/мл); через 65 мин исследовали кинетику синтеза белка.

Также как в гепатоцитах печени (Deskaropoulos et al., 2012), в эпидермисе кожи определены D2 рецепторы дофамина (Fuziwara et al., 2005). Об этом говорят и наши данные с ликвидацией ритма синтеза белка в клетках HaCaT при действии на них

дофамина (рис. 4). В контроле, в суточных культурах в бессывороточной среде, как и ранее (Бродский и др. 2011, см. также рис. 1), наблюдали ритм синтеза белка (рис. 4а). Дофамин ликвидировал ритм: 11 проб из 12 достоверно не различались

и входили в пределы средней для всего опыта  $\pm$   $\pm$  ошибка (рис. 4б). Мелатонин, действуя вместе с дофамином, предотвращал дезорганизацию ритма (рис. 4в). В опыте также подтверждены данные о рецепторах D<sub>2</sub>, активация которых дофамином дезорганизует ритм в культурах HaCaT. Блокирование D<sub>2</sub> рецепторов метоклопрамидом (церукалом) снимало действие дофамина (рис. 4г).

Показанием к применению дофамина в клинике являются шоковые состояния различной этиологии: кардиогенный, травматический, эндотоксический, послеоперационный шок и др. Дофамин действует на D<sub>2</sub> рецепторы, вызывая расширение почечных, мезентериальных, коронарных и мозговых сосудов. В низких и средних дозах дофамин применяют для улучшения гемодинамики при острой сердечной или сосудистой недостаточности, развивающихся при различных патологических состояниях. Тканевой дофамин играет важную роль в адаптации человека к кровопотерям и травмам. Предшественник дофамина ДОФА, проникающий через гематоэнцефалический барьер, используют при болезнях Паркинсона и Альцгеймера. Активация D<sub>2</sub> рецепторов влияет на синтез и секрецию кератиноцитами цитокинов IL-6 и IL-8 (Parrado et al., 2012). Эти интерлейкины, особенно IL-6, усиливают пролиферацию эпидермальных клеток и, тем самым, способствуют заживлению ран. Однако избыточный синтез IL-6 приводит к гиперплазии фибробластов и к образованию уродливого “келоидного” рубца.

При инъекции малых доз дофамина взрослому человеку начальная его концентрация в крови составляет примерно 0.2–0.7 мкг/мл крови. Мы вводили в среду с гепатоцитами или культурами HaCaT 0.4 мкг/мл дофамина. Синтез специфических белков – одна из основных функций гепатоцитов; в печени синтезируются и продуцируются белки плазмы крови. Синтез специфических белков – одна из функций кератиноцитов. Ритм синтеза белка – результат синхронизации активности клеток при прямых межклеточных взаимодействиях (Бродский, 2014). Взаимодействия клеток регулируют многие клеточные и органнне функции; их нарушения могут быть тяжелее влияний на кинетику синтеза белка. Данные о факторах-организаторах кинетики синтеза белка – мелатонине или ганглиозидах, исправляющих дезорганизующее действие дофамина (Brodsky et al., 2012), внушают надежду компенсации отрицательных эффектов дофамина. Не менее значимы данные настоящей работы, показавшей, что дофамин одновременно с мелатонином вообще не проявляет свой дезорганизующий эффект. Ранее было показано, что ганглиозиды и катехоламины, сигнальные факторы организации синтеза белка, как, соответственно, и их рецепторы, функционируют

независимо друг от друга (Звездина и др., 2008). Также было показано, что мелатонин, однократно введенный крысе, организует ритм синтеза белка сутки после инъекции. Стоит обратить внимание на взаимодействие адренорецепторов и дофаминовых рецепторов, тем более, что норадреналин и адреналин образуются из дофамина и некоторые их свойства сходные. Возможно, расширение этих данных приведет к рекомендации вводить мелатонин или другой организатор прямых межклеточных взаимодействий перед инъекцией пациенту дофамина.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-00189.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я. Околочасовые метаболические ритмы // Биохимия. 2014. Т. 79. № 6. С. 621–634.
- Бродский В.Я., Терских В.В., Васильев А.В., Звездина Н.Д., Воротеляк Е.А., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Самоорганизация ритма синтеза белка в культурах HaCaT кератиноцитов человека // Онтогенез. 2011. № 4. С. 312–319.
- Звездина Н.Д., Мальченко Л.А., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Сигнальные факторы саморганизации ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов – ганглиозиды и катехоламины – функционируют независимо друг от друга // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 3. С. 198–207.
- Beaulieu J.-M., Gainetdinov R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors // Pharmacol. Rev. 2011. V. 63. P. 182–217.
- Brodsky V.Y., Konchenko D.S., Dubovaja T.K., Zvezdina N.D., Malchenko L. Unlike norepinephrine and serotonin, dopamine disorganizes direct cell-cell communication in hepatocyte cultures // J. Cell and Tissue Res. 2012. V. 12. № 3. P. 3265–3271.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I. Gangliodide-mediated synchronization of the protein synthesis activity in cultured hepatocytes // Cell Biology Internat. 2000. V. 24. № 4. P. 211–222.
- Daskalopoulos E., Lang M., Marselos M., Malliou F., Kostandi M. D<sub>2</sub>-Dopaminergic receptor-linked pathways: critical regulators of CYP3A, CYP2C, and CYP2D // Molecular Pharmacology. 2012. V. 82. P. 668–678.
- Fuziwara S., Suzuki A., Inoue K., Mitsuhiro D. Dopamine D<sub>2</sub>-like receptor agonists accelerate barrier repair and inhibit the epidermal hyperplasia induced by barrier disruption // J. Invest. Dermatol. 2005. V. 125. P. 783–789.
- Guillemot J., Compagnon P., Cartier D., Thouennon E., Bastard C., Lihrmann I., Pichon P., Thuillez E., Bertherat J., Anouar Y., Kuhn J.-M., Yon L., Lefebvre H. Metoclopramide stimulates catecholamine- and granin-derived peptide secretion from pheochromocytoma cells through activation of serotonin type 4 (5-HT<sub>4</sub>) receptors // Endocr. Relat. Cancer. 2009. V. 16. P. 281–290.
- Parrado A., Canellada A., Gentile T., Rey-Roldan E. Dopamine agonists upregulate IL-6 and IL-8 production in human keratinocytes // Neuroimmunomodulation. 2012. V. 19. P. 359–366.

## Dopamine Disorganizes Direct Intercellular Interactions in Keratinocytes Cultures: a Comparison to Hepatocytes

V. Ya. Brodskii<sup>a</sup>, E. A. Vorotelayk<sup>a</sup>, V. V. Terskikh<sup>a</sup>, A. V. Vasil'ev<sup>a</sup>, L. A. Mal'chenko<sup>a</sup>,  
D. S. Konchenko<sup>b</sup>, T. K. Dubovaya<sup>b</sup>, and N. D. Zvezdina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: brodsky.idb@bk.ru*

<sup>b</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

Received March 23, 2015; in final form, October 24, 2015

Dopamine in the concentration 0.4 µg/mL abolishes protein synthesis rhythm in HaCaT keratinocytes and hepatocytes unlike noradrenaline or melatonin, which synchronize direct intercellular interactions and organize protein synthesis rhythm. Experiments with D2 dopamine receptors blocking agent metoclopramide (tserukal) in the concentration 2 µg/mL show that a disorganizing effect of dopamine is driven by the activation of D2 receptors, which block adenylyl cyclase and the efflux of calcium ions from internal depositions according to the literature. It is shown that tserukal does not activate serotonin receptors in our experimental settings. Cellular interactions' recovery during or after dopamine action is carried out by melatonin in the concentration 0.001 µg/mL. A recommendation to inject melatonin before dopamine administration for different medical indications is discussed.

*Keywords:* intercellular interactions, protein synthesis kinetics, keratinocytes, HaCaT cultures, hepatocytes, dopamine, dopamine receptors, melatonin, tserukal