

3. Coin J.T., Olson J.S. The Rate of Oxygen Uptake by Human Red Blood Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1979, vol.25, pp. 1178-1190.
4. Mjrow J.I. A New High Resolution Stopped-Flow Apparatus. *Chemical Instrumentation*, 1970, vol. 2 (4), pp. 375-387.
5. Hartridge H., Roughton F.J. The rate of distribution of dissolved gases between the red blood corpuscle and its fluid environment. *J. Physiol.*, 1927, vol. 62, pp. 232-242.
6. Ivanov I.I., Fedorov G.E., Gus'kova R.A., Ivanov K.I., Rubin A.B. Permeability of lipid membranes to dioxygen. *BBRC*, 2004, vol. 322, pp. 746-750.
7. Delnomdedieu M., Boudou A., Desmazès J.P., Georgescauld D. Interaction of mercury chloride with the primary amine group of model membranes containing phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, vol. 986 (2), pp. 191-199.
8. Ciani H., Burt D.P., Daniele S., Unwin P.R., Effect on Surface Pressure on Oxygen Transfer across Molecular monolayers at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem.*, 2004, vol. 108, pp. 3801-3809.

### ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Котова П.Д., Колесникова А.С., Черкашин А.П., Рогачевская О.А., Колесников С.С.

Институт биофизики клетки РАН

г. Пущино, Россия

e-mail: polinakotova88@gmail.com

**Аннотация.** Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию пролиферирующих недифференцированных клеток, которые способны давать начало различным линиям клеток мезенхимного происхождения. Несмотря на значительный прогресс в исследовании МСК, текущие представления об их рецепторных и сигнальных системах весьма ограничены. В данной работе показано, что АТР и другие агонисты пуринаргических рецепторов (АДР, УТР, УДР) стимулируют  $Ca^{2+}$  сигнализацию в МСК, выделенных из жировой ткани человека. Спектр эффективных агонистов и незначительное влияние наружного  $Ca^{2+}$  свидетельствовали о ключевой роли в этих ответах P2Y рецепторов. Методом ОТ-ПЦР в популяции МСК выявлена экспрессия P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> рецепторов. В индивидуальных же МСК эти рецепторы функционируют в различных комбинациях, а основную роль в генерации  $Ca^{2+}$ -ответов на пуринаргические агонисты играют P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> рецепторы.

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, пуринаргические рецепторы.

### PURINORECEPTORS IN HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Kotova P.D., Kolesnikova A.S., Cherkashin A.P., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Pushchino, Russia

e-mail: polinakotova88@gmail.com

**Abstract.** Mesenchymal stromal cells (MSCs) represent a heterogeneous population of proliferating non-differentiated cells that capable of originating a variety of mesenchymal cell lineages. Despite tremendous progress in MSC biology, current knowledge on receptor and signaling systems of MSCs is mediocre. Here we showed that ATP and other purinergic agonists, including ADP, UTP, UDP stimulate  $Ca^{2+}$  signaling in a subpopulation of MSCs derived from the human adipose tissue. The rank of agonist efficacies and negligible influence of extracellular  $Ca^{2+}$  on cellular responses argued that purinergic transduction in MSCs largely involved P2Y receptors. By the RT-PCR analysis revealed expression of P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> purinoreceptors in MSC. In individual MSC these receptors function in different combinations, but the main role in generation  $Ca^{2+}$ -responses to purinergic agonists play P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> receptors.

**Key words:** mesenchymal stromal cells, purinoreceptors.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой недифференцированные мультипотентные клетки, популяция которых поддерживается за счет пролиферации, и которые способны дифференцироваться в клетки как минимум костной, хрящевой и жировой тканей [1, 2]. МСК могут быть выделены из многих тканей взрослого организма, однако основными их источниками служат костный мозг и жировая ткань.

На сегодняшний день МСК интенсивно исследуются, однако, большинство работ по их исследованию посвящены оценке их трансплантационного потенциала, исследованию механизмов, инициирующих и направляющих их дифференцировку и анализу возможности управлять этими процессами *in vitro*. Гораздо меньше внимание уделяется фундаментальным исследованиям сигнальных процессов в этих клетках. В силу этого существующие представления о рецепторных и сигнальных системах МСК весьма ограничены.

Известно, что повреждение тканей ассоциируется с выбросом большого количества АТР во внеклеточную среду, а внеклеточный АТР и продукты его последовательного гидролиза эктонуклеотидазами – АДР и аденозин – являются первичными медиаторами, вовлеченными в межклеточные коммуникации и паракринные и аутокринные регуляции в самых разнообразных клеточных системах организма [3, 4]. Поэтому можно ожидать,

что пуринергическая сигнальная система является естественной частью системы регуляции клеточных функций МСК.

В данной работе исследовалась экспрессия МСК пуринергических рецепторов и их функциональная активность.

#### **Материалы и методы.**

**Выделение МСК из жировой ткани и их культивирование.** МСК человека выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров (возраст от 31 до 50 лет,  $n = 17$ ). Жировую ткань измельчали и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл) (Worthington, США) и диспазы (40 ед/мл) (Sigma, США) в соотношении объема ткани к объему ферментативного раствора 1:2. Суспензию инкубировали при 37° С в течение 30-60 мин, периодически встряхивали. Затем к полученной суспензии для инактивации ферментов добавляли равный объем среды Advance Stem (HyClone, США), содержащей 10 % Advance Stem Supplement (HyClone), и центрифугировали при 200 g 10 мин. Супернатант и верхнюю фракцию адипоцитов удаляли. Осадок ресуспендировали и лизировали эритроциты. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (BD Bioscience, США). Клетки ресуспендировали в среде роста (см. ниже), высаживали в чашки Петри в количестве 100 тыс. клеток/мл и инкубировали при 37° С, 5 % CO<sub>2</sub>. На следующий день меняли среду для удаления неприкрепленных клеток. Выделенные МСК культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США) и/или в 12-луночном планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10 % Advance Stem Supplement (HyClone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. При достижении 80 % монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем рассаживали в соотношении 1:3. В экспериментах использовали МСК 2-4 пассажей.

**Подготовка клеток к эксперименту.** Перед экспериментом клетки культивировали в 12-луночный планшет в среде роста (см. выше) без антибиотика в течение 12 ч. Затем клетки двукратно промывали раствором Версена (Sigma). Для отделения от субстрата клетки инкубировали 2-3 мин в 200 мкл фермента HyQTase (HyClone). Фермент ингибировали добавлением 800 мкл полной ростовой среды, клетки ресуспендировали и помещали в пробирку для центрифугирования. Клетки концентрировали в нижней части пробирки при 50 g в течение 45 с. Клетки прикрепляли с помощью Cell Tak (BD Biosciences, США) на дно фотометрической камеры, представляющей собой покровное стекло (Menzel\_Glaser, Германия) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным Ca<sup>2+</sup>-зондом Fluo-4. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23-25° С) в присутствии проникающего аналога Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (Molecular Probes, США) 20 мин, в течение которых гидролиз внутриклеточными эстеразами ацетоксиметилового группы Fluo-4 AM продуцировал остаточное количество Fluo-4. Затем клетки при 4° С в течение 40 мин отмывали внеклеточным раствором, содержащим (мМ): 110 NaCl, 5.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 10 HEPES, 10 глюкоза, в котором они выдерживались. В экспериментах с пониженным до цитоплазматического уровня содержанием Ca<sup>2+</sup>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub> во внеклеточном растворе заменяли на 0.5 мМ EGTA + 0.4 мМ CaCl<sub>2</sub>, в этом случае концентрация свободного Ca<sup>2+</sup> составляла 260 нМ.

**Микрофотометрия.** Эксперименты проводились с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждалась на длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссия регистрировалась в области 535 ± 20 нм. Каждые 0,5 секунды регистрировались последовательные флуоресцентные изображения. Изменение концентрации цитозольного кальция в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ( $\Delta F/F_0$ ). Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

**ОТ-ПЦР.** Для проведения ОТ-ПЦР культивируемые МСК отделяли от субстрата. Из образца, содержащего 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> клеток МСК выделяли тотальную РНК с помощью набора RNeasy mini kit (Qiagen), следуя рекомендациям производителя. Изолированную РНК обрабатывали ДНКазой из набора DNA-Free (Ambion). Обратную транскрипцию проводили с использованием случайных праймеров-гексамеров ревертазы Superscript III (Invitrogen) 1 час при 50° С. Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими праймерами с использованием готовой смеси для ПЦР с горячим стартом от Eurogen.

#### **Результаты и обсуждение.**

Ранее нами было показано, что популяция МСК гетерогенна по чувствительности к различным агонистам рецепторов, таким как АТР, карбахол, ГАМК, серотонин, норадреналин и др. [5]. В настоящей работе анализировали Ca<sup>2+</sup> сигналы, инициируемые пуринергическими агонистами в цитоплазме МСК, с использованием метода микрофотометрии (Ca<sup>2+</sup> imaging) и Ca<sup>2+</sup>-индикатора Fluo-4, также анализировали экспрессию генов пуринорецепторов с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и ген-специфических праймеров.

Клетки, чувствительные к АТР, генерировали Ca<sup>2+</sup> ответы на другие природные агонисты пуринорецепторов, такие как АDP, УТР и UDP ( $n=125$ ) (рис. 1). Это свидетельствовало о ключевой роли метаболитных P2Y рецепторов в генерации клеточных ответов, и незначительном вкладе P2X рецепторов, являющихся АТР-активируемыми Ca<sup>2+</sup>-проницаемыми катионными каналами [6].

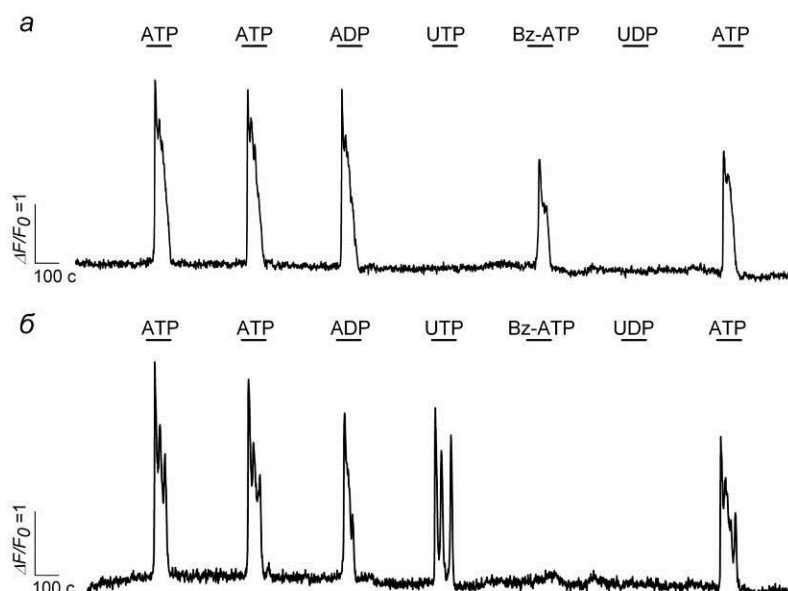


Рисунок 1 – Ответы МСК на агонисты пуринорецепторов. Представлены репрезентативные регистрации ( $n=125$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов двух клеток, иллюстрирующие определенную специфичность к различным агонистам.

Здесь и далее начало и длительность стимуляций обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальной кривой. Вещества апплицировали в следующих концентрациях: АТР – 2 мкМ, АДФ – 2 мкМ, УТР – 10 мкМ, Bz-АТР – 10 мкМ, UDP – 10 мкМ

Более того, МСК оказались способны генерировать полноценные  $\text{Ca}^{2+}$  ответы на АТР в условиях пониженного до цитоплазматического уровня содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в наружном растворе ( $n=61$ ) (рис. 2), что подтверждает предыдущий вывод об основном вкладе в ответ P2Y рецепторов, т.к. генерация  $\text{Ca}^{2+}$  ответа в бескальциевой среде была бы невозможна при основном вкладе P2X рецепторов, представляющих из себя катионные каналы.

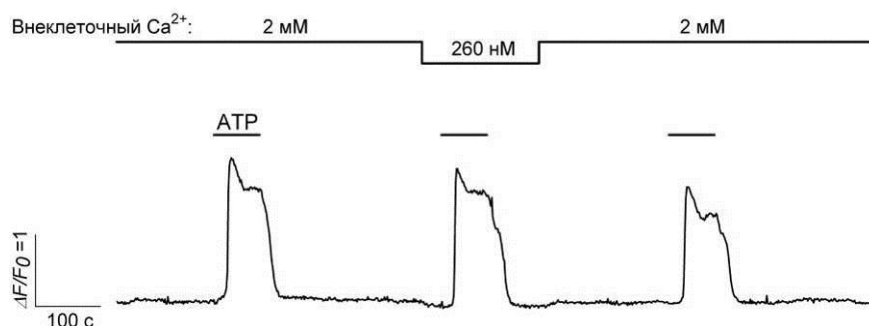


Рисунок 2 – Репрезентативная регистрация ( $n=61$ ), демонстрирующая незначительное влияние наружного  $\text{Ca}^{2+}$  на чувствительность МСК к АТР (2 мкМ). Верхняя линия иллюстрирует изменение концентрации внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . При 260 нМ  $\text{Ca}^{2+}$  в наружном растворе 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  заменяли на 0.5 мМ EGTA + 0.4 мМ  $\text{CaCl}_2$

Пуринорецепторы P2Y типа характеризуются определенной специфичностью к природным агонистам, которая несколько варьирует от вида к виду. В случае P2Y рецепторов человека установлено следующее соответствие между рецепторами нуклеотидов и их полными природными агонистами [4, 7]: P2Y<sub>1</sub> (АДФ), P2Y<sub>2</sub> (АТР, УТР), P2Y<sub>4</sub> (УТР), P2Y<sub>6</sub> (UDP), P2Y<sub>11</sub> (АТР), P2Y<sub>12</sub> (АДФ), P2Y<sub>13</sub> (АДФ), P2Y<sub>14</sub> (UDP, UDP-glucose).

Не смотря на то, что в целом популяция АТР-чувствительных МСК генерировала  $\text{Ca}^{2+}$  ответы на все использовавшиеся природные агонисты (АТР, АДФ, УТР, UDP), индивидуальные МСК генерировали ответы лишь на некоторые из них. Из 125 клеток, чувствительных к пуринергическим агонистам, на АТР отвечали 87,2 % клеток ( $n = 109$ ), на АДФ – 51,2 % ( $n = 64$ ), на УТР – 44,8% ( $n = 56$ ) и на UDP – 2,4 % ( $n = 3$ ) (рис. 3). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что практически все пуринергические МСК чувствительны к АТР (функционируют P2Y<sub>2</sub> и/или P2Y<sub>11</sub> рецепторы), многие чувствительны к АДФ (функционируют P2Y<sub>1</sub> и/или P2Y<sub>12</sub> и/или P2Y<sub>13</sub>) и УТР (функционируют P2Y<sub>2</sub> и/или P2Y<sub>4</sub>), тогда как к UDP чувствительно лишь незначительное количество МСК (функционируют P2Y<sub>6</sub> и/или P2Y<sub>14</sub>).

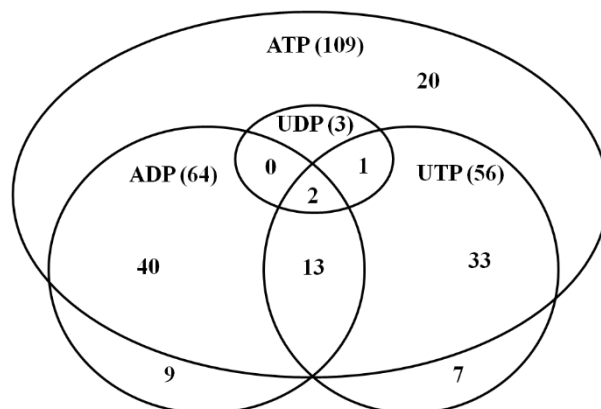


Рисунок 3 – Венская диаграмма количественного соотношения субпопуляций пуринергических МСК, генерирующих  $\text{Ca}^{2+}$  ответы на различные природные агонисты пуринергических рецепторов

Помимо функциональных тестов (рис. 1 - рис. 3) нами был проведен анализ экспрессии генов пуринергических рецепторов, используя ОТ-ПЦР и ген-специфические праймеры. Все исследованные образцы РНК ( $n = 5$ ) содержали транскрипты генов P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> рецепторов, в то время как транскрипты генов P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> рецепторов были недетектируемы (рис. 4).

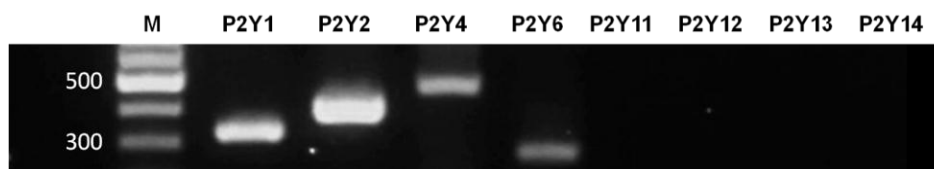


Рисунок 4 – Результат анализа экспрессии мРНК транскриптов пуринорецепторов в МСК методом ОТ-ПЦР. Над каждой дорожкой геля указаны анализируемые гены. М – маркер молекулярных весов. В исследуемой популяции обнаружены транскрипты P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> пуринорецепторов

Таким образом, совокупность физиологических данных и данных молекулярнобиологических экспериментов свидетельствуют о том, что в МСК экспрессируются и функционируют P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> рецепторы. Количественное соотношение субпопуляций МСК, генерирующих ответы на природные агонисты P2Y рецепторов свидетельствует о том, что основную роль в генерации МСК  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на пуринергические агонисты играют P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> и P2Y<sub>4</sub> рецепторы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-14-00687) и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 16-34-00210 и 14-04-01711-а).

#### Список литературы / References:

1. Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.*, 2007, vol. 213 (2), pp. 341-347.
2. Dominici M., Paolucci P., Conte P., Horwitz E.M. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation.*, 2009, vol. 87, pp. S36-S42.
3. Matsuoka I., Ohkubo S. ATP- and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: Adenosine Receptor Activation by ATP Through Rapid and Localized Generation of Adenosine by Ecto-nucleotidases. *J. Pharmacol. Sci.*, 2004, vol. 94, pp. 95-99.
4. Burnstock G. Purinergic signaling: its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays.*, 2012, vol. 34, pp. 218-225.
5. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.*, 2014, vol. 1843, pp. 1899-1908.
6. Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R.A., Seguela P., Voigt M., Humphrey P.P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.*, 2001, vol. 53, pp. 107-118.
7. Magni, G., Ceruti, S. P2Y purinergic receptors: new targets for analgesic and antimigraine drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 2013, vol. 85 (4), pp. 466-477.