

шая, лечение должно быть комплексным с использованием современных лекарственных средств.

Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности включения лазеротерапии и «Холисал-геля» в комплексное лечение красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта, так как они оказывают выраженное противовоспалительное действие, сокращают сроки лечения, позволяют увеличить период ремиссии

ЛИТЕРАТУРА

1. Барер Г. М., Перламутрова В. Ю. Опыт применения препарата «Холисал-гель» при лечении катарального гингивита в стадии хронического течения // XI Национальный Российский конгресс «Человек и лекарство». — М., 2004. — С. 78.
2. Королева Н. В. Факторы персистенции условно-патогенных бактерий при красном плоском лишае слизистой оболочки полости рта: Дис. ... канд. мед. наук. — Волгоград, 2001. — 120 с.

3. Прохончуков А. А. // Стоматология для всех. — 2004. — № 3. — С. 2

4. Терапевтическая стоматология / Под редакцией профессора Л. А. Дмитриевой. — М., 2003. — 894 с.

5. Питерская Н. В., Шилина С. В. Лечение красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта с применением препарата «Тыквеол» в сочетании с излучением гелий-неонового лазера // Актуальные вопросы современной стоматологии: Материалы конференции, посвященной 75-летию Волгоградского государственного медицинского университета, 45-летию кафедры терапевтической стоматологии и 40-летию кафедры ортопедической стоматологии / Под общ. ред. акад. В. И. Петрова. — Волгоград: ООО «Бланк», 2010. — 44 с.

Контактная информация

Питерская Наталия Валерьевна — к. м. н., ассистент кафедры терапевтической стоматологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: Piterskij.k@yandex.ru

УДК 616.155.015:57.085.23:576.522

СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ЛЕЙКОЗА К КОММУНИКАЦИИ ЧЕРЕЗ ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ

П. П. Несмиянов, А. М. Богданова, Дж. Д. Латия, М. Хитоми, А. И. Хуанг, А. В. Стрыгин

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра иммунологии и аллергологии ВолгГМУ,
Волгоградский медицинский научный центр,
Исследовательский институт Лернера, Кливлендская клиника,
Школа медицины университета Кейс Вестерн Резерв, г. Кливленд, США*

Один из видов межклеточной коммуникации — через щелевые контакты, опосредованные коннексинами, — позволяет клеткам обмениваться информацией и крайне важен для функционирования нормальных и опухолевых клеток. В данной статье мы демонстрируем возможность формирования функциональных гомотипных щелевых контактов между клетками Т-клеточного лейкоза Jurkat.

Ключевые слова: щелевые контакты, межклеточные коммуникации, лейкоз, клетки Jurkat.

LEUKEMIC CELLS CAN COMMUNICATE THROUGH GAP JUNCTIONS

P. P. Nesmiyanov, A. M. Bogdanova, J. D. Lathia, M. Hitomi, A. Y. Huang, A. V. Strygin

Cell-cell communication is vital to proliferation and survival in homeostatic and disease states. This process is regulated by the gap junction family of proteins that utilize connexin subunits to enable communication between adjacent cells. To find out if cell-cell communication was occurring between cells of the same lineage, we used Jurkat cells as a model system.

Key words: gap junctions, cell-cell communication, leukemia, Jurkat cells.

Щелевые контакты (ЩК) — основная форма непосредственных межклеточных контактов у млекопитающих [7]. Такие контакты опосредованы взаимодействием коннексинных каналов. ЩК представлены и в иммунной системе, и играют важную роль в гемопоэзе, презентации антигена, пролиферации и активации лимфоцитов, а также участвуют в формировании сигнальных путей, необходимых для развития воспаления, экстравазации клеток, ангиогенеза и метастатических процессов [6, 8]. До настоящего времени не существовало

прямых доказательств гомотипных ЩК между лимфоцитами, хотя для других типов иммунных клеток такие взаимодействия показаны [3] и играют весьма важную функциональную роль, как и гетеротипные ЩК между лимфоцитами и другими типами клеток [5]. При патологических процессах роль ЩК практически не изучена, хотя при лимфопролиферативных процессах вероятность и частота их формирования может быть увеличена за счет расширения пула лимфоцитов и может в той или иной мере определять патогенез заболе-

вания путем регуляции обмена малыми молекулами и инициирования слияния клеток. Известно, что ЩК между молекулами стромы и лимфоцитами влияют на чувствительность к химиотерапии [9, 10], а также показана роль коннексин-опосредованного сигналинга в терапии острых миелобластных лейкозов [4]. Таким образом, роль гомотипных ЩК в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний не установлена, равно как неизвестно их значение для нормального функционирования клеток. Выяснение значимости гомотипных ЩК в патогенезе лимфом и лейкозов может способствовать развитию нового направления в комбинированной терапии этих заболеваний, что особенно актуально по причине недостаточной эффективности и частого побочного действия существующих видов химиотерапии [1].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Установить возможность формирования функциональных гомотипных щелевых контактов между клетками Jurkat.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры. В качестве материала исследования использовались клетки линии Jurkat, клон Е6-1, которые культивировались в стандартных условиях в стартовой концентрации 5×10^5 кл/мл в среде RPMI-1640 (Life Technologies) с добавлением 10%-й сыворотки плода коровы (Sigma), 10 мМ HEPES (Life Technologies), 2 мМ L-глутамин (Life Technologies), 0,1 мМ смеси аминокислот (Life Technologies), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола (Fluka) и 2 мМ пирувата натрия (Life Technologies) при 37°C и 5%-й CO_2 . Плотность клеток поддерживалась на уровне 10^6 кл/мл. Жизнеспособность клеток оценивалась перед проведением каждого эксперимента с использованием трипанового синего и составляла не менее 95 %.

Мечение клеток. Клетки метились трекерами Vybrant Dil (Dil) и CellTrace Calcein AM (кальцеин) (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки в концентрации 10^6 кл/мл инкубировались в безсывороточной среде в присутствии Dil (5 мкл/мл клеточной взвеси) в течение 2 мин при 37°C (для клеток-акцепторов) или присутствии кальцеина (0,4 мкл/мл клеточной взвеси) в течение 40 мин при 37°C (для клеток-доноров). После этого клетки отмывали трехкратным центрифугированием при 1500 rpm в течение 5 мин в среде RPMI-1640 при 37°C . Затем клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл полной среды. Для оценки жизнеспособности при проточной цитометрии использовали краситель SYTOX Blue (Life Technologies).

Ингибирование щелевых контактов. 1-октанол (Sigma-Aldrich) растворяли в среде RPMI-1640 и добавляли в каждую пробирку со взвесьями клеток в концентрации 1 мМ или 10 мкМ. Карбенексон (CBX) (Sigma-Aldrich) растворяли в среде RPMI-1640 и добавляли в каждую пробирку со взвесьями клеток в концентрации 100 мкМ или 1 мкМ. Клетки, предварительно меченые

кальцеином и Dil, инкубировали в среде RPMI-1640 в присутствии или в отсутствии ингибиторов при 37°C и 5%-й CO_2 в течение 5 часов. После 5 часов инкубирования донорные и акцепторные клетки смешивали в соотношении 1:1 в 24-луночных планшетах для микроскопии и в пробирках для проточной цитометрии.

Визуализация последствий формирования щелевых контактов. Изображения взаимодействующих клеток были получены с использованием системы time-lapse микроскопии (Leica). Для этого применяли съемку с интервалом 10 мин в фазово-контрастном режиме и режиме флуоресценции в течение 5 ч после смешивания клеток-доноров и клеток-акцепторов.

Проточная цитометрия. Количественный анализ переноса метки производился методом проточной цитометрии спустя 60 и 90 минут после смешивания клеток-доноров и клеток-акцепторов. Оценивалась только жизнеспособная популяция клеток (методом исключения с красителем SYTOX Blue). Измерения производились с использованием цитометра Fortessa и ПО CellQuest (BD Biosciences, США), анализ данных производился с использованием ПО FlowJo (Tree Star, США).

Статистический анализ. Все результаты показаны в виде среднего со стандартной ошибкой среднего для пяти и более независимых экспериментов. Значимость различий оценивали с использованием одностороннего ANOVA-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки коммуникации между клетками Jurkat мы оценивали степень пассивного переноса трекера между клетками, происходящего через щелевые контакты. В данном случае пассивному переносу подвергается только кальцеин, молекулярная масса которого позволяет ему проникать через каналы, образуемые коннексинами, в то время как Dil является мембранной меткой и не переносится от клетки к клетке (рис. 1), что позволяет исключить перенос, опосредованный простым слиянием клеток.

С помощью флуоресцентной микроскопии регистрируется перенос кальцеина, заметный спустя примерно 150 минут после смешивания клеток и продолжающийся в течение примерно 60 минут (рис. 2).

Задержка в формировании щелевых контактов может быть объяснена тем фактом, что суспензионным клеткам Jurkat требуется время для формирования монослоя на дне лунки. Пролонгированный контакт клеток в этих условиях удается зарегистрировать с большим трудом. Помимо этого свою роль играет фотоблещивание трекера. Вышеперечисленные факторы затрудняют количественную оценку формирования щелевых контактов.

С помощью проточной цитометрии нам удалось произвести количественную оценку переноса кальцеина с максимумом переноса во временной точке 90 мин (рис. 3). После совместной инкубации процент клеток-акцепторов, в которые произошел перенос кальцеина, достигал 39,4 %.

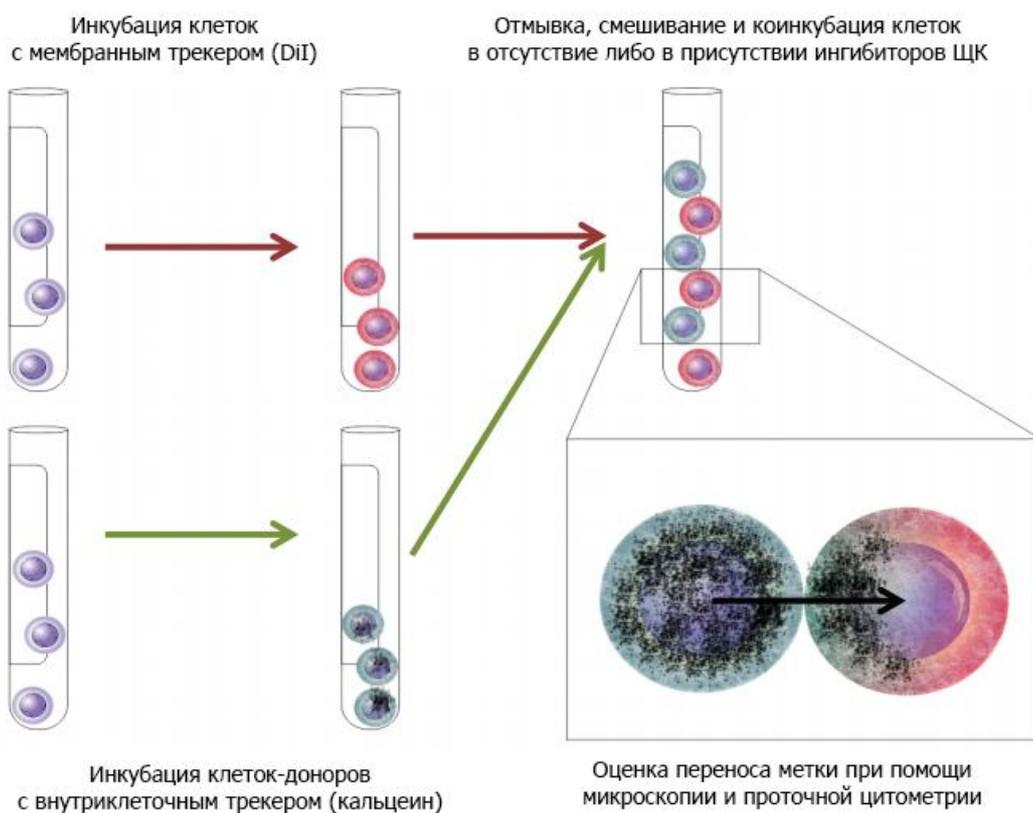


Рис. 1. Экспериментальный подход, используемый в исследовании

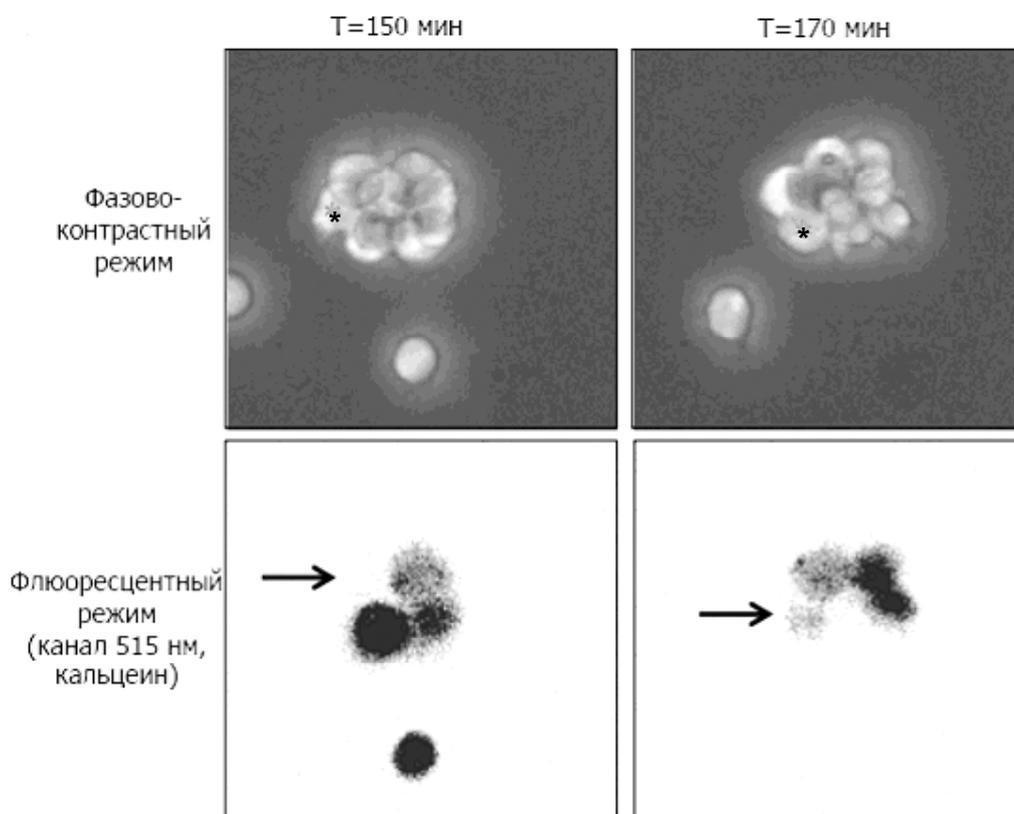


Рис. 2. Микрофотографии, демонстрирующие перенос кальцеина. Клетка-акцептор помечена звездочкой на фазово-контрастном изображении и отмечена стрелкой на флуоресцентном изображении

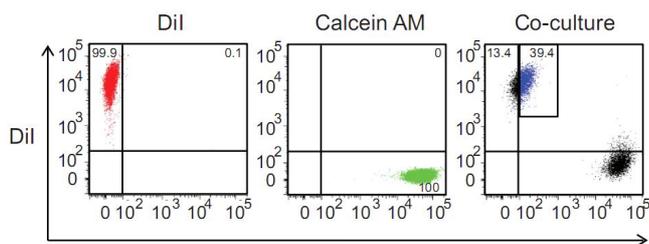


Рис. 3. Регистрация переноса кальцеина методом проточной цитометрии. Гейтирование выполнено по одиночно позитивным клеткам, меченым Dil либо кальцеином

Для подтверждения того, что перенос трекера происходил именно через щелевые каналы, мы использовали контроль с селективными ингибиторами формирования щелевых контактов — 1-октанолом и CBX. Оба ингибитора подавляли перенос трекера (рис. 4).

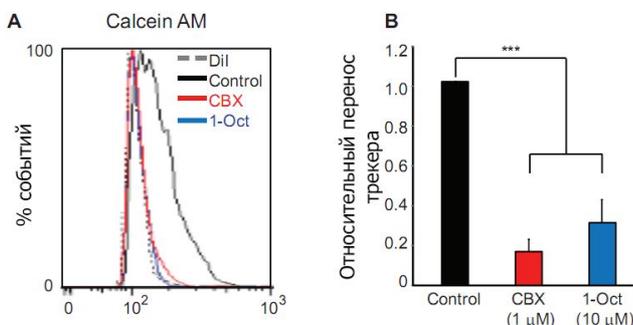


Рис. 4. Гистограмма проточной цитометрии (А), демонстрирующая подавление переноса кальцеина под действием ингибиторов ЩК; относительное подавление переноса кальцеина под действием ингибиторов ЩК, *** $p < 0,001$

В концентрации 10 мкМ, 1-октанол эффективно подавлял перенос трекера на 30 %. В концентрации 1 мМ подавление переноса также было значительным, но 1-октанол оказывал токсическое действие на клетки Jurkat. CBX подавлял перенос трекера на 16 % в концентрации 1 мкМ, похожие результаты были достигнуты с использованием концентрации 100 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши результаты демонстрируют, что пролиферирующие клетки лейкоза могут взаимодействовать между собой, что может играть роль в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний. Дальнейшие исследования необходимы для определения того,

как подобная межклеточная коммуникация может влиять на процессы выживания, пролиферации, хоминга, самообновления клеточных популяций и как на эти процессы можно повлиять применением ингибиторов щелевых контактов. Кроме того, интерес представляют конкретные сигнальные молекулы, которые могут переноситься от клетки к клетке после формирования щелевых контактов, и какие сигнальные пути могут активироваться в ходе таких взаимодействий.

Работа поддержана грантами «NIH K99/R00 Pathway to Independence Award (CA157948)», «V Scholar Award from the V Foundation for Cancer Research», NIH R01 (CA154656), Fulbright Faculty Development Program (15121721).

ЛИТЕРАТУРА

1. Теплякова Е. Д., Тарасова Н. Е., Пармон С. П. и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2011. — № 3 (39) — С. 66—69.
2. Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W., et al. // BioTechniques. — 2008. — Vol. 45 (1). — P. 33—52, 56—62.
3. Eugenin E. A., Branes M. C., Berman J. W., et al. // Journal of immunology. — 2003. — Vol. 170 (3). — P. 1320—1328.
4. Foss B., Tronstad K. J., Bruserud O. // Biochimica et biophysica acta. — 2010. — Vol. 1798 (1). — P. 1—8.
5. Mendoza-Naranjo A., Bouma G., Pereda C., et al. // Journal of immunology. — 2011. — Vol. 187 (6). — P. 3121—3132.
6. Neijssen J., Herberts C., Drijfhout J. W., et al. // Nature. — 2005. — Vol. 434 (7029). — P. 83—88.
7. Nicholson B. J. // Journal of cell science. — 2003. — Vol. 116 (Pt 22). — P. 4479—4481.
8. Oviedo-Orta E., Howard Evans W. // Biochimica et biophysica acta. — 2004. — Vol. 1662 (1—2). — P. 102—112.
9. Paraguassu-Braga F. H., Borojevic R., Bouzas L. F., et al. // Cell death and differentiation. — 2003. — Vol. 10 (9). — P. 1101—1108.
10. Taniguchi Ishikawa E., Gonzalez-Nieto D., Ghiaur G., et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2012. — Vol. 109 (23). — P. 9071—9076.

Контактная информация

Несмиянов Павел Павлович — к. м. н., доцент кафедры иммунологии и аллергологии, м. н. с. лаборатории геномных и протеомных технологий ГБУ ВМНЦ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: nesmiyanovp@volgmed.ru