

We have found that median content of CD39+ Treg cells was significantly decreased in HA+ fraction compared with HA- subset ( $p < 0.05$ ), though higher density of CD39 expression was observed in HA+ subset ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

We did not identify any significant difference in number in of freshly isolated HA+ and HA- CD4+CD25+ T cells with intracellular expression of IL-10 (0.8% and 1.5% respectively). Since CD4+CD25+ population is known to show increased expression of effector/memory markers (CD45RA/CD45RO), it was of interest to analyze these surface markers on Treg cells with different expression of active isoforms of CD44. As it turned out, there were no differences between HA+ and HA- subsets by these markers (Fig. 5, 6). On the basis of our data we propose that in norm circulating natural Treg cells contain the subset capable of binding high molecular hyaluronan, i.e. expressing an activated form of CD44. Such cells are in a state of readiness to control possible emergence of immune autoreactivity. Though HA+ subset contains less FoxP3+ Treg cells than HA- counterpart CD39 expression on them is higher, that indicates their suppressor potential. Our approach to assessment of Treg cell activity could be useful for studying autoimmune disease and cancer development.

#### References

- 1 Sakaguchi S. et al. Regulatory T cell and immune tolerance//Cell.-2008.-N133.-P.775-787.
- 2 Allan S.E. et al. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation- independent expression of FOXP3//Mol. Ther.-2008.-N16.-P. 194-202.
- 3 Nishikawa H. Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity//Int. J. Cancer.-2010.-N127.-P.759-767.
- 4 Nakamura K. et al. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta//J. Exp. Med.-2001.-N194.-P.629-644.
- 5 Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T cells work//Nat. Rev. Immunol.-2008.-N.8.-P.523-532.
- 6 DeGrendele H.C. et al. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation//J. Immunol.-1997.-N.159.-P.2549-2553.
- 7 Lesley J. et al. Hyaluronan binding function of CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response//J.Exp.Med.-1994.-N.180.-P.383-387.
- 8 Ariel A. et al. Induction of interactions between CD44 and hyaluronic acid by a short exposure of human T cells to diverse pro-inflammatory mediators//Immunology.-2000.-N.100.-P.345-351.
- 9 Bollyky P.L. et al. CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF- $\beta$ //J.Immunol.-2009.-N.183.-P.2232-2241.
- 10 Firan M. et al. Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44//Blood.-2006.-V.107.-N.2.-P.619-627.

УДК: 612.75:574.6

Ж. Б. <sup>1</sup>Сабырбек\*, Ю.А. <sup>2</sup>Ким, <sup>1</sup> С.Т. Тулеуханов

<sup>1</sup>Казахский Национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия

e-mail: [Zhanna.Sabyrbek@kaznu.kz](mailto:Zhanna.Sabyrbek@kaznu.kz)

#### Способы регистрации особенностей экзоцитоза при запуске сигнальной трансдукции

Недостаточно исследованной стадией экзоцитоза является акт слияния гранулярных и плазматических мембран с последующим выбросом содержимого гранул во внеклеточное пространство. Для исследования указанной проблемы были апробированы ряд методических приемов регистрации экзоцитоза на клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и перитонеальных макрофагах мышей.

**Ключевые слова:** асцитной карциномы, экзоцитоз, сигнальная трансдукция

J.B. Sabyrbek, Kim J.A. Kim, S.T. Tuleuhanov

#### How to register the features of exocytosis at start signal transduction

Insufficiently investigated stage of exocytosis is the act of merging granular and plasma membrane with subsequent release of granule contents into the extracellular space. To investigate this problem have been tried a number of instructional techniques registration exocytosis on cells of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) and peritoneal macrophages of mice.

**Keywords:** ascites, exocytosis, signal transduction

Изучение механизмов экзоцитоза в контексте условий, способствующих малигнизации клеток, является актуальной проблемой онкологии. В связи с чем, изучение связи механизмов экзоцитоза в

опухолевых клетках с физико-химическими свойствами клеточных мембран является новой, так как могут быть обнаружены новые возможности профилактики и терапии онкологических заболеваний.

#### Материалы и методы

Объектами исследований были клетки АКЭ и для сравнения клетки иммунной системы – перитонеальные макрофаги мышей.

Выделение перитонеальных макрофагов. После забоя мышку фиксировали на спине, делали разрез по средней линии передней брюшной стенки и осторожно отсепааровывали кожный лоскут, не нарушая целостности брюшины. Через прокол иглой, соединенной со шприцем, в брюшную полость вводили среду 199 или среду Игла с гепарином (5 ед. на 1 мл среды) в объеме 3 мл. Осторожно массируют переднюю брюшную стенку. Через 1 час в брюшине пастеровской пипеткой, соединенной с резиновой грушей, собирали содержимое, сливали через нейлоновый фильтр на пластиковые чашки Петри диаметром 9 - 14 см и инкубировали в течение 1 часа при 37°C в избытке CO<sub>2</sub>. По истечении срока инкубации среду с не прилипшими клетками удаляли. Прилипшие к пластику клетки дважды отмывали стерильным забуференным физиологическим раствором pH 7,2. Для получения взвеси прилипших к пластику клеток в чашку добавляли 1,5 ± 0,5 мл среды 199 и осторожно снимали прилипшие клетки. Полученную взвесь пипетировали несколько раз до исчезновения крупных агрегатов и переносили в охлажденную круглодонную пробирку. Определение жизнеспособности клеток проводится общепринятыми методами по отношению к трепановому синему. Жизнеспособность клеток в тесте с трепановым синим составлял 94-96%, а выход - не менее 95%

Изменение формы и размеров клеток в результате процессов связанных с экзоцитозом регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции гидрофобного красителя 1-[4-(trimethylamino) phenyl]-6-phenyl-hexa-3,5 triene (TMA-DPH) ( $\lambda_{возб.}$ =360 нм,  $\lambda_{флуор.}$ =430 нм), а также по рассеянию света в суспензии под прямым углом на длине волны  $\lambda = 620$  нм на спектрофлуориметре Perkin Elmer MPF -44B при температуре 37 °C и постоянном перемешивании. В качестве флуоресцентного зонда для регистрации экзоцитоза по изменению концентрации секретлируемых продуктов был использован акридиновый оранжевый ( $\lambda_{возб.}$ =490 нм,  $\lambda_{флуор.}$ =530 нм).

Клетки предварительно инкубировали с красителем (2 мкМ) при 37 °C в течение 20 минут, затем отмывали средой инкубации 2 раза и удаляли надосадочную жидкость центрифугированием при 900 об/мин.

Высвобождение АТФ из клеток при стимуляции экзоцитоза регистрировали с помощью люциферин-люциферазного теста [1] на хемилюминометре LKB 1250 Luminometer. В качестве блокаторов кальциевых каналов были использованы нифедипин и верапамил в концентрации 10 мкМ. Визуально клеточный ответ на стимуляцию экзоцитоза наблюдали и регистрировали с помощью конфокального лазерного микроскопа LSM 510 Carl Zeiss Jena GERMANY.

Индукторами экзоцитоза являлись: - компонент 48/80 (Sigma, USA), инициирующий выход гистамина из клеток [2], уровень которого определяли по методу [3]; - ионофоры A23187 и иономицин (Sigma, USA); - АТФ (Sigma, USA); - температура.

#### Результаты и их обсуждение

На клетках АКЭ были отработаны три способа регистрации экзоцитоза в реальном времени. В основе первой из них лежит изменение формы и размеров клеток в ходе экзоцитоза, которая регистрировалась по изменению светорассеяния в клеточной суспензии (Рисунок 1А). Как видно на приведенном рисунке, индуктор экзоцитоза компонент 48/80 [4] вызывает быстрое изменение светорассеяния суспензии клеток АКЭ, которое связано с изменением их формы и размера. Однако, только один этот параметр не может быть критерием исследуемого процесса, потому что клеточный ответ в виде изменения размера является результатом многих процессов происходящих внутри клетки, в том числе и экзоцитоза, при запуске сигнальной трансляции.

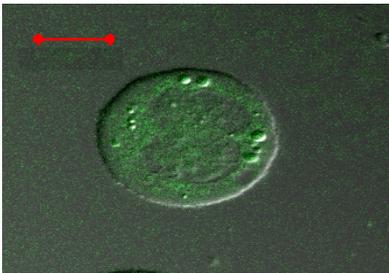
Более прямой способ основан на том, что pH внутренней среды большинства секреторных гранул слабо кислый [5,6], вследствие чего слабо основные флуоресцентные зонды (например, акридиновый оранжевый) аккумулируются внутри этих гранул. Интенсивность флуоресценции внутри клеток гасится вследствие высокой концентрации и протонирования молекул флуорофора и, кроме того, он становится более гидрофильным и теряет способность выхода в цитозоль. В ходе экзоцитоза краситель высвобождается, при этом из-за разбавления хромофора изменяется интенсивность и

спектр флуоресценции, что позволяет регистрировать секреторный процесс в суспензии клеток на спектрофлуориметре. Этот способ стал использоваться сравнительно недавно для изучения освобождения нейромедиаторов и нейроэктоцитоза в синаптосомах и изолированных пресинаптических окончаниях [7-9].

Стандартная методика регистрации явления эктоцитоза основана на анализе титрования секретлируемых продуктов, в частности гистамина о-фталевым альдегидом [3]. При этом образуется окрашенный комплекс, который можно регистрировать флуориметрическим методом.

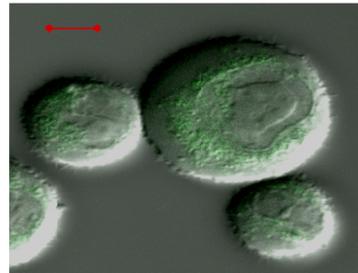
Как видно на приведенном рисунке 1В, компонент 48/80 инициирует выход молекул гистамина, что является результатом запуска процесса эктоцитоза в клетке. Индуктором эктоцитоза может выступать и увеличение температуры среды инкубации клеток.

Отбор проб для измерения выхода гистамина производили после достижения стационарного состояния клеток по исследуемому параметру. Предварительные флуориметрические измерения показали, что при инициировании эктоцитоза повышением температуры уровень гистамина, вышедшего из клеток, достигает стационарного состояния через 5 минут. Таким образом, все три параметра – увеличение интенсивности флуоресценции с о-фталевым альдегидом (образует комплекс с молекулами гистамина, вышедшими из клеток), акридинового оранжевого во внеклеточной среде в результате выхода из клеток и увеличение интенсивности рассеянного света (изменение размера и формы клеток) в ответ на компонент 48/80 отражают процесс эктоцитоза.



**Рисунок 1А** - Клетки асцитной карциномы Эрлиха, обработанные акридиновым оранжевым (2 мкМ).  $\lambda_{\text{возб}}=490$  нм,  $\lambda_{\text{изл}}=530$  нм.

Конфокальная лазерная микроскопия. Метка 10 мкм



**Рисунок 1Б** - Клетки асцитной карциномы Эрлиха, обработанные акридиновым оранжевым (2 мкМ) и компонентом 48/80 (3 мкг/мл)

Конфокальная лазерная микроскопия. Метка 5 мкм

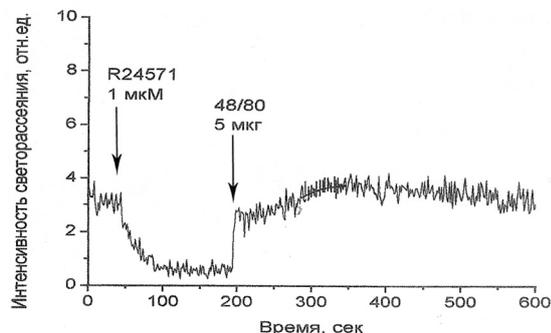
Визуально клеточный ответ связанный с процессом эктоцитоза на клетках асцитной карциномы Эрлиха, обработанных акридиновым оранжевым [10], наблюдали на конфокальном сканирующем микроскопе (Рисунок 1 А,Б). После обработки клеток компонентом 48/80 наблюдается слияние отдельных гранул (интергранулярное слияние), после чего происходит процесс диффузии образовавшихся везикул с плазматической мембраной и выброс красителя во внеклеточное пространство. Исследование распределения зондов внутри клеток на конфокальном микроскопе производилось на конечной стадии процесса эктоцитоза. Конфокальная микроскопия позволяла регистрировать лишь начальный и конечный этапы процесса эктоцитоза. Процессы появления вакуолей в цитоплазме, их слияния, движения к периферии клеток и выход во внеклеточное пространство наблюдали с помощью люминисцентного микроскопа.

Действие компонента 48/80, представляющего собой олигомерную смесь конденсированных продуктов N-метил-п-метоксифениленамина и формальдегида, основано на том, что он активирует G-белки сигнальной системы [11]. Эктоцитоз, инициируемый компонентом 48/80 может быть прерван на этапе связывания кальция с кальмодулином, являющимся медиатором активации ферментов. Препарат R24571 (кальмидазолиум) обратимо связывается с белком, и ингибирует его (Рисунок 2).

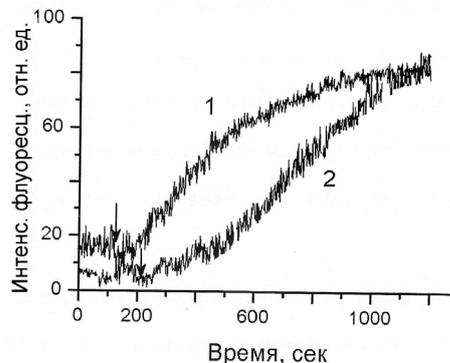
В качестве индукторов эктоцитоза кроме компонента 48/80 (Рисунок 1А,Б,В) использовались и другие специфичные ионофоры, действие которых связано с изменением концентрации внутриклеточного кальция, например A23187 и иономицин [3,11,12], Рисунок 5.

Согласно геометрии и природе сайта связывания ионофоры демонстрируют различную специфичность к катиону. Иономицин и ионофор A23187 селективны в отношении к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и поэтому широко используются для изучения секреции в различных системах.

Иономицин вызывает концентрационно – зависимое высвобождение гистамина из клеток [12]. Высвобождение, индуцируемое ионофором A23187 и иономицином не цитотоксично и блокируется метаболическими ингибиторами и ферментными ядами. Действие этих индукторов основано на мобилизации внутриклеточных запасов  $\text{Ca}^{2+}$  (Рисунок 6).



**Рисунок 2** - Изменение интенсивности рассеяния света в суспензии клеток АКЭ при последовательном введении компонента 48/80 (5 мкг/мл) и препарата R24571 (1 мкМ). Концентрация клеток –  $10^7$ /мл,  $\lambda_{\text{рассеяния}} = 620$  нм



**Рисунок 3** - Изменение флуоресценции ТМА-DPH (0,3 мкМ) при индуцировании экзоцитоза в клетках асцитной карциномы Эрлиха 0,6 мкМ иономицина (1) и 5 мкг/мл 48/80 (2) соответственно. Концентрация клеток  $10^7$ /мл,  $\lambda_{\text{возб}}=350$  нм  $\lambda_{\text{изл}}=428$  нм

Так было показано, что компонент 48/80 и A23187 используют различные источники  $\text{Ca}^{2+}$  для запуска экзоцитоза. A23187 способствует проникновению в клетку кальция из внешней среды, в то время как компонент 48/80 вызывает выход ионов из внутриклеточных депо через активацию фосфоинозитидного пути.

Это подтверждается действием нифедипина, который ингибирует потенциал-чувствительные кальциевые L-каналы дигидропиридинового типа [11], АКЭ была использована в качестве удобной и хорошо изученной модели клетки (в плане внутриклеточной сигнальной системы). Для сравнения были выбраны перитонеальные макрофаги мышей, которым в большей степени присущи процессы эндо-и экзоцитоза, и следовательно, слияние мембран.

Акридиновый оранжевый флуоресцирует зеленым светом (максимум эмиссии 520 нм) в мономерах и желто-оранжевым (максимум эмиссии 600 нм) в олигомерах. Свечение зеленым светом является результатом выхода краски из клеток в процессе экзоцитоза. Оранжево-желтая флуоресценция позволяет определить положение, внутриклеточный pH и движение гранул.

Использование акридинового оранжевого не дает ответа на вопрос о том, происходит ли слияние мембран секреторных пузырьков с плазматической. Поэтому при титровании секретированных продуктов в качестве титрата часто используют катионный липофильный флуоресцентный краситель ТМА-DPH [13-15]. В водной суспензии этот краситель взаимодействует исключительно с плазматическими клетками. Фракция ТМА-DPH, включенная в мембраны в состоянии равновесия пропорциональна концентрации последних. В ходе экзоцитоза происходит слияние отдельных секреторных гранул, а также множественное интергранулярное слияние, что ведет к значительному увеличению мембранной поверхности в контакте со внешней средой, и как следствие, к изменению интенсивности флуоресценции [14].

Изменение площади поверхности клетки в ходе экзоцитоза оценивали по изменению флуоресценции катионного липофильного красителя ТМА-DPH (Рисунок 4). В водной суспензии этот краситель включается во внешний листок мембраны, находящийся в контакте с внешней средой. Фракция ТМА-DPH, включенная в мембраны в состоянии равновесия, пропорциональна концентрации последних. При стимуляции экзоцитоза компонентом 48/80 и иономицином наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции, что свидетельствовало о росте площади поверхности мембраны клеток, находящихся в контакте с внешней средой. Наблюдаемые отличия в характере ответа клеток на стимуляцию экзоцитоза иономицином и компонентом 48/80 предположительно обусловлены тем, что данные секретогены вызывают запуск  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого экзоцитоза, используя различные сигнальные пути [12,16]. Достоинством данного метода является простота и экспрессность, однако, к сожалению, он не позволяет ответить на вопрос о том, происходит ли

полное слияние секреторных везикул с мембраной клетки или оно осуществляется по так называемому механизму «kiss and run».

В работах [17, 18] было доказано, что одним из продуктов, секретируемых клетками АКЭ, является АТФ. Концентрацию АТФ в экстраклеточной среде измеряли с помощью люциферин-люциферазного метода. Стимуляцию клеток производили иономицином.

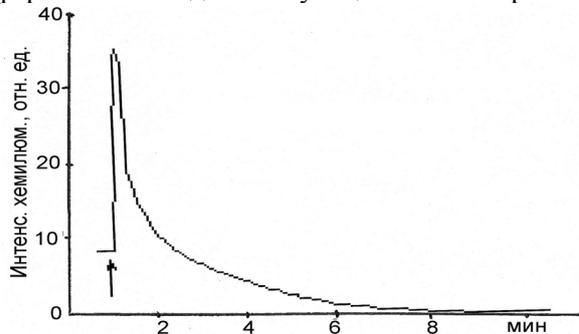


Рисунок 4 - Изменение интенсивности хеминиллюминисценции в суспензии клеток АКЭ ( $10^8$ /мл) при стимуляции 0.16 мкМ иономицина (указано стрелкой).

Наблюдаемые различия в кинетиках изменения концентрации АТФ и вышеописанных параметров (интенсивности светорассеяния и флуоресценции красителей), возможно, обусловлены тем, что число гранул, содержащих АТФ, мало по сравнению с общим количеством экзоцитозных гранул. Поэтому при стимуляции экзоцитоза не происходит скачкообразного увеличения площади поверхности клетки или изменения ее формы. Данный способ регистрации экзоцитоза является очень удобным, поскольку позволяет непосредственно наблюдать прирост секретируемого в экстраклеточную среду продукта в виде АТФ.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать следующие выводы: - методически отработаны способы регистрации процесса экзоцитоза в клетках АКЭ при использовании различных индукторов кальциевой сигнализации; - показано действие некоторых ингибиторов кальциевой сигнальной системы на процесс экзоцитоза.

#### Литература

- 1 М. Е. Ладыгина, А. Б. Рубин / Биофизические методы в физиологии растений. М. Издательство «Наука» 1971.]
- 2 Rothschild A. M. (1970). "Mechanisms of histamine release by compound 48/80". // Br. J. Pharmacol., 38 (1): 253–262
- 3 Parhurst A. Shore, Alan Burkhalter, Viktor H. Cohn (1959). "A method for the fluorometric assay of histamine in tissues" // J. Pharmacol. Exp. Therapeutica, 127:182-186
- 4 Kawasaki Yukishige, Saitoh Takako, Okabe Toshiya, Kumakura Kounosuke and Ohara-Imaizumi Mica (1991). "Visualization of exocytotic secretory processes of mast cells by fluorescence techniques" // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. V. 1067, (5): 71-80
- 5 Anderson, R.G.W., Orci, L. (1988). "A view of acidic intracellular compartments". //Journal of Cell Biology, 106: 539-543
- 6 Holz, R. W. (1986). "The role of osmotic forces in exocytosis from adrenal chromaffin cells" // Annu. Rev. Physiol. 48: 175-189 .
- 7 Zoccarto, F., Cavallini L. and Alexandre A. (1999). «The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes». // J. Neurochem. 72: 625–633.
- 8 Waseem T.V., Rakovich A. A., Lavrukevich T.V., Konev S.V. and Fedorovich S.V. (2005) « Calcium regulates the mode of exocytosis induced by hypotonic shock in isolated neuronal presynaptic endings.// Neurochemistry International, 46, (3): 235-242
- 9 Васим Т.В., Федорович С.В., Конеv С.В. (2003). "Effect of osmolar concentration of culture media on exocytosis in isolated presynaptic nerve endings of rat brain" // Биофизика, 48, 5: 880-883.
- 10 Haugland R. P. (2002). // Handbook of Fluorescent Probes and Research Products P. 269-278, 489-491.
- 11 Chahdi A., Fraundorfer P. F. and Beaven M.A. (2000). «Compound 48/80 Activates Mast Cell Phospholipase D via Heterotrimeric GTP-Binding Proteins» // J. of Pharmacology and Experimental Therapeutica, 292 (1): 122-130
- 12 Abramov A.Y., Duchon M. R. (2003) "Actions of ionomycin, 4-BrA23187 and a novel electrogenic Ca<sup>2+</sup> ionophore on mitochondria in intact cells." // Cell Calcium. 33 (2): 101-112
- 13 Heemskerk J.W.M, Feijje M. A.H, Andree H.A.M, Sage S.O. (1993). « Function of intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in exocytosis and transbilayer movement in human platelets surface-labeled with the fluorescent probe 1-(4-(trimethylammonio)phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene» // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1147, 2, (22): 194-204.
- 14 Kok J.W., Hoekstra D. (1999) « Fluorescent Lipid Analogues: Applications in Cell and Membrane Biology» // Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity (Second Edition), P. 136-155 .
- 15 Martial Kubina, François Lanzab, Jean-Pierre Cazenaveb, Gilbert Laustriata and Jean-Georges Kuhrya (1987). «Parallel investigation of exocytosis kinetics and membrane fluidity changes in human platelets with the fluorescent probe, trimethylammonio-diphenylhexatriene» // Biochimica et Biophysica Acta, 90, (10) : 138-146.
- 16 Morgan A. Burgoyne RD. (1998) "Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function". //Bioessays. 20: 328-335.