

УМЕНЬШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ТРАНСФОРМИРОВАННЫМ ФИБРОБЛАСТАМ 3Т3-SV40, ОБРАБОТАННЫМ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ

© Н. А. Филатова, К. М. Кирпичникова, И. А. Гамалей¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Длительное присутствие антиоксиданта N-ацетилцистеина (НАС, 10 мМ) в среде культивирования трансформированных мышинных фибробластов линии 3Т3-SV40 не меняет их чувствительность к литическому действию естественных киллеров (ЕК) — спленоцитов мышей. Удаление НАС из среды культивирования приводит к тому, что через 18—20 ч активность ЕК по отношению к клеткам 3Т3-SV40 значительно уменьшается: значение цитотоксического индекса (ЦИ) становится равным 4.6 ± 2.4 (против 31.8 ± 2.4 в контроле), приближаясь к значению ЦИ нетрансформированных клеток. Нормальные мышинные фибробласты 3Т3 в тех же экспериментальных условиях сохраняют устойчивость к действию ЕК. Данные свидетельствуют о том, что действие НАС может приводить к частичной реверсии трансформированного фенотипа клеток 3Т3-SV40. Предполагается, что частичная реверсия трансформированного фенотипа связана с изменением структуры и свойств поверхностных белков клетки и, возможно, компонентов внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: естественные киллеры, трансформированные фибробласты, цитотоксический индекс, N-ацетилцистеин.

Литическая активность естественных киллеров (ЕК) относится к целому ряду показателей, по которым оценивают иммунный статус организма. ЕК — это несенсибилизированные большие гранулярные лимфоциты, осуществляющие не зависимый от антител и комплемента лизис широкого спектра клеток-мишеней — опухолевых, зараженных вирусами и некоторых нормальных (как эмбриональных, так и клеток зрелого организма). ЕК играют важную роль в иммунном надзоре за состоянием клеточной пролиферации и цитодифференцировки (см. обзор: Moretta, Moretta, 2004).

Несмотря на то что ЕК открыты еще 30 лет назад и интенсивно изучаются, до сих пор до конца неясна природа и тех структур, которые распознаются на клетках-мишенях, и тех, которые служат распознающими детерминантами у ЕК. Одним из методических приемов для решения этой проблемы служит обработка клеток-мишеней агентами, которые изменяют их поверхностный фенотип, в результате чего одни поверхностные антигены экспрессируются дополнительно, а другие утрачиваются, вследствие чего чувствительность клеток-мишеней к действию ЕК может существенно изменяться. К числу таких агентов относятся активные формы кислорода (АФК) и антиоксиданты. Немногочисленные данные из литературы свидетельствуют о попытках понять и определить роль этих соединений во взаимоотношениях ЕК и клеток-мишеней. Полученные результаты противоречивы (Van Kessel et al., 1987; Malori et al., 1994; Nariai (Nakada) et al., 2000), а эксперименты (in vivo и in vitro), описывающие влияние антиоксидантов

на разные показатели иммунного статуса организма, позволяют сделать лишь самый общий вывод: для поддержания гомеостаза иммунной системы необходим определенный редокс-баланс (Viora et al., 2001; Watzl et al., 2003).

В предыдущих работах мы показали, что прямое действие антиоксидантов, в том числе N-ацетилцистеина (НАС), вызывает и функциональные, и морфологические изменения нормальных и трансформированных клеток (Гамалей и др., 2003, 2004; Ефремова и др., 2004). У клеток 3Т3-SV40 эти изменения выражаются в частичной реверсии трансформированного фенотипа (Гамалей и др., 2004; Ефремова и др., 2004).

Задача настоящей работы — выяснить, как обработка трансформированных клеток 3Т3-SV40 антиоксидантом НАС влияет на способность ЕК иммунной системы распознавать и лизировать эти клетки.

Материал и методика

Клетками-мишенями служили эмбриональные мышинные фибробласты линии Balb/3Т3 (клетки 3Т3) и такие же фибробласты, трансформированные вирусом SV40 (клетки 3Т3-SV40), а также клетки эритробластоэза человека K562. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки до образования монослоя. Антиоксидант НАС (Sigma, США) вводили в среду

культивирования клеток до конечной концентрации 10 (для клеток 3Т3-SV40) или 20 (3Т3) mM на 24 ч. Затем среду заменяли на свежую, не содержащую НАС, и культивировали еще 24 ч. Переживающие культуры клеток фотографировали с помощью цифровой фотокамеры.

Клетки-эффекторы выделяли из селезенки интактных мышей-самцов линии СЗНА массой 18—20 г, полученных из питомника «Рапполово» РАН. Из селезенки готовили клеточные суспензии, освобожденные от эритроцитов с помощью осмотического шока по описанной ранее методике (Малыгин, Апреликова, 1982), и подсчитывали в камере Горяева количество ядросодержащих клеток — спленоцитов.

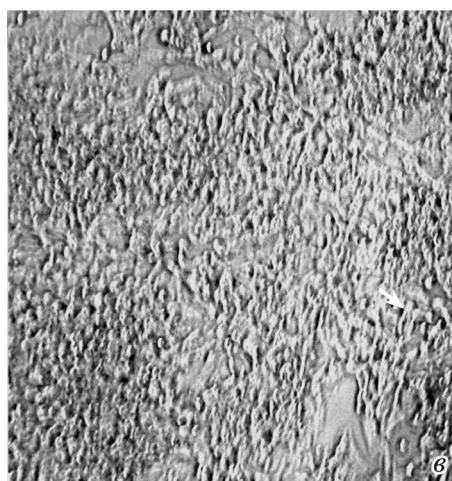
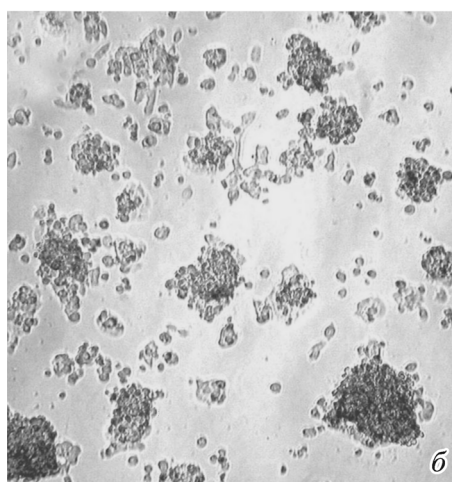
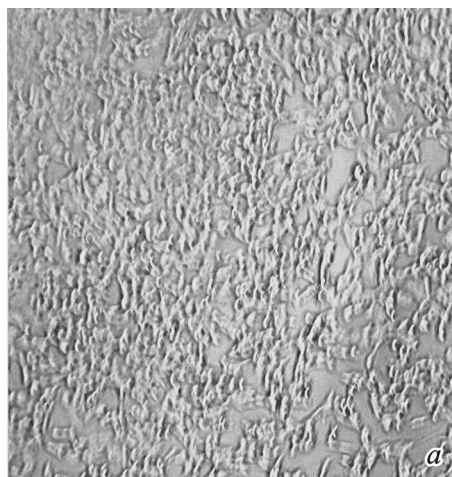
Естественную киллерную активность спленоцитов (клеток-эффекторов) оценивали с помощью ^3H -уридинового цитотоксического теста (Hashimoto, Sudo, 1971) в модификации Рыковой с сотрудниками (1981). Клетки-мишени метили ^3H -уридином, после чего клетки отмывали от остатков ^3H -уридина и НАС. Соотношение эффекторов и мишеней составляло 20 : 1. Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в %.

Результаты

Клетки 3Т3 являются иммортализованными нетуморогенными фибробластами и широко используются в различных исследованиях как нетрансформированные в качестве контрольных (нормальных) клеток в паре с трансфицированными фибробластами 3Т3 (Rubin et al., 1996; Rubin, 2001). Трансфекция клеток 3Т3 большим Т-онкогеном вируса SV40 приводит к клеточной трансформации в результате стабильной интеграции плазмидной ДНК в геном клетки-хозяина (Verge et al., 1995).

Введение 10 mM НАС в культуральную среду клеток 3Т3-SV40 на 5—20 ч вызывает постепенное изменение их морфологии. На прижизненной фотографии клеток (см. рисунок, а, б) видно, что клетки теряют контакты, округляются, клеточный монослой разрушается, и эти изменения, как мы показали ранее, коррелируют с разборкой актиновых нитей и появлением в клетках скопленных аморфного актина (Ефремова, 2004). Удаление антиоксиданта путем замены культуральной среды на новую, не содержащую НАС, приводит к полному восстановлению клеточного монослоя (см. рисунок, в). Аналогичная картина наблюдается и для клеток 3Т3 (фотографии не показаны).

Данные, представленные в таблице, показывают, как изменяются физиологические свойства, а именно чувствительность к действию ЕК трансформированных фибробластов 3Т3-SV40, подвергнутых действию НАС. Перед проведением цитотоксического теста НАС всегда удаляли из среды. Литическая активность ЕК по отношению к клеткам 3Т3-SV40, культивируемым в течение 20 ч в присутствии НАС, практически не меняется. Однако через 18—24 ч после удаления антиоксиданта функциональные свойства клеток принципиально изменились — ЦИ снизился приблизительно в 7 раз (с 31,8 до 4,6 %), что означает потерю чувствительности трансформированных клеток 3Т3-SV40 к ЕК. И это свойство сохраняется клетками еще 1 сут, т. е. в целом в течение 48 ч после удаления антиоксиданта. Необходимо заметить, что в течение опыта все процедуры (добавление



Прижизненные фотографии клеток 3Т3-SV40 в норме (а), через 20 ч после введения в среду культивирования антиоксиданта N-ацетилцистеина (б) и через 24 ч после удаления его из среды (в).

Об. 6.3×, ок. 4×.

НАС и его последующее удаление) осуществляли только со средой, оставляя клетки на одной и той же подложке без пересева. Если через 24 ч после удаления НАС клетки пересевать, то их чувствительность к ЕК возрастает почти в 2 раза по сравнению с клетками, не подвергавшимися пересеву (см. таблицу). Таким образом, клетки

Естественная киллерная активность спленоцитов мышей СЗНА по отношению к клеткам 3Т3-SV40 и 3Т3, обработанным N-ацетилцистеином (НАС)

Клетки-мишени	Условия обработки	ЦИ, % $\bar{x} \pm s_x$
К562 3Т3-SV40	—	19.9 \pm 2.8
	—	31.8 \pm 2.4
	Введение 10 мМ НАС, 20 ч	27.8 \pm 4.1
	Удаление НАС, 24 ч	4.6 \pm 2.4
	Удаление НАС, 48 ч	5.9 \pm 2.3
3Т3	Удаление НАС с пересевом клеток, 24 ч	9.6 \pm 4.8
	—	0.7 \pm 0.4
	Введение 20 мМ НАС, 20 ч	5.3 \pm 1.4
	Удаление НАС, 24 ч	2.2 \pm 0.6

Примечание. Соотношение клеток-эффекторов и клеток-мишеней составляет 20 : 1. Для каждого случая даны средние значения цитотоксического индекса (ЦИ) из 12—18 измерений в трех экспериментах.

3Т3-SV40 в восстановленном после удаления НАС монослое приобретают признаки нетрансформированных клеток 3Т3 и перестают узнаваться ЕК.

Данные для нормальных клеток 3Т3 также представлены в таблице. Во всех вариантах опытов (в присутствии НАС и после его удаления) их чувствительность к действию ЕК остается на очень низком уровне. Отмечено лишь незначительное увеличение литической активности ЕК по отношению к клеткам 3Т3, находящимся 18—20 ч в присутствии НАС. Для сравнения мы провели эксперименты с клетками К562, которые используют в цитотоксическом тесте в качестве критерия литической активности ЕК (Chernysh et al., 2002). ЦИ в данном случае оказался даже меньше (19.9 %), чем для клеток 3Т3-SV40, контрольных и прошедших обработку НАС (см. таблицу).

Обсуждение

Ранее мы показали ряд морфологических и функциональных изменений клеток в присутствии НАС (Гамалей и др., 2001, 2003; Ефремова и др., 2004). Все эти изменения обратимы, если только не позднее чем через 24 ч удалить НАС из среды культивирования клеток, в противном случае клетки погибают (Гамалей и др., 2003). Но клетки 3Т3-SV40, как показало настоящее исследование, не возвращаются после удаления НАС в исходное состояние (по крайней мере в течение 2 сут), а приобретают некое новое состояние с чертами, характерными для нормальных клеток 3Т3. Присутствие НАС изменяет редокс-баланс клетки, повышая содержание глутатиона и увеличивая устойчивость к окислительному стрессу (Spolarics, Wu, 1997), но обратимо (Гамалей и др., 2004). Клетки 3Т3-SV40, прошедшие обработку НАС с последующим удалением его из среды культивирования, вместе с морфологическими изменениями претерпевают и физиологические, а именно: как и нормальные клетки, 3Т3 перестают узнаваться и лизироваться ЕК, что подтверждает сделанный ранее вывод о частичной реверсии трансформированного фенотипа (Гамалей и др., 2004; Ефремова и др., 2004).

Антиоксидант НАС является источником сульфгидрильных групп и используется в экспериментальной и клинической практике как восстанавливающий агент, сдвигающий окислительно-восстановительный баланс клетки в сторону антиоксидантов, главным образом восстановленного глутатиона — основного восстановительного компонента клетки (Spolarics, Wu, 1997; см. обзор: Zaffarulah, 2003). Биологические эффекты, вызываемые действием НАС на клетки, и внутриклеточные молекулярные события, ведущие к ним, чрезвычайно разнообразны и не описываются единой схемой (Zafarullah et al., 2003). Так, например, НАС усиливает адгезию эпидермоидных клеток А431 и естественных киллеров (Rivabene et al., 1995), в эндотелиальных клетках влияет на экспрессию адгезивных молекул (Walther et al., 1999), способен *in vivo* предотвращать канцерогенез, инвазию и метастазирование эндотелиальных клеток (Aluigi et al., 2000), ингибировать инвазию опухолевых клеток за счет уменьшения продукции и активности матриксной металлопротеиназы 9 (Kawakami et al., 2001), менять активность транскрипционных факторов (Гончар и др., 2003; см. литературу в обзоре: Zafarullah, 2003). Эти и многие другие примеры говорят о том, что этот простой антиоксидант способен вмешиваться глубоко во внутриклеточные процессы. Поскольку НАС обратимо останавливает пролиферацию нормальных клеток 3Т3, но не останавливает пролиферацию трансформированных клеток 3Т3-SV40 (Гамалей и др., 2003), можно предполагать сохранность генома трансформированных клеток при его действии.

По современным представлениям, основой узнавания ЕК клеток-мишеней является наличие специальных рецепторов у ЕК (с общим названием «рецепторы естественной цитотоксичности»), к которым на поверхности у клеток-мишеней имеются лиганды различного типа (см. обзор: Moretta, Moretta, 2004). Наличие таких молекул является сигналом к инактивации литической активности ЕК. Процесс клеточной трансформации и (или) вирусные инфекции приводят к утрате или недостаточной экспрессии этих лигандов, что делает клетку-мишень доступной для взаимодействия с ЕК и последующего лизиса (Long, Rajagopalan, 2002; Moretta, Moretta, 2004). Кроме того, как недавно показано, стрессовые факторы могут модифицировать молекулы-лиганды киллерных рецепторов на поверхности клеток-мишеней, в результате чего уменьшается ингибирование клеткой-мишенью литической активности ЕК, и клетка-мишень может быть распознана и лизирована ЕК (Long, Rajagopalan, 2002; Michaëlsson et al., 2002).

Введение НАС в среду нормальных клеток 3Т3, по-видимому, является тем стрессовым фактором, который вызывает некоторое увеличение их ЦИ, но, во-первых, оно полностью обратимо, а во-вторых, оно не столь значительно, чтобы рассматривать его как принципиальное изменение свойств этих клеток. Уменьшение чувствительности (вплоть до ее потери) к литической активности ЕК клеток 3Т3-SV40, прошедших обработку НАС, можно объяснить только тем, что НАС, восстанавливая SH-группы каких-то поверхностных белков клетки, меняет в конце концов и ее свойства. Причем изменение свойств клетки происходит не в присутствии антиоксиданта, а лишь после его удаления. Пока трудно сказать, почему именно удаление антиоксиданта приводит к появлению новых свойств у трансформированных клеток. Можно лишь предполагать, что путь возврата клеток к исходному состоянию после удаления антиоксиданта не

повторяет путь изменений, которые они претерпели в его присутствии в силу вызванных им необратимых изменений. Изменения могут происходить не только с белками самой клетки, но и с компонентами внеклеточного матрикса. В пользу этого предположения говорят данные экспериментов, в которых клетки 3Т3-SV40 после удаления НАС снимали с подложки и пересеивали на новые чашки. В этом случае чувствительность клеток 3Т3-SV40 к ЕК существенно возрастала по сравнению с клетками, не подвергавшимися пересеву в ходе всего эксперимента.

Итак, обнаруженное нами изменение активности ЕК по отношению к трансформированным клеткам, обработанным НАС в условиях нашей экспериментальной модели, свидетельствует прежде всего об изменении свойств поверхности клеток-мишеней. Возникновение новых свойств может быть связано не только с изменениями поверхностных структур клетки и стоящими за ними внутриклеточными событиями, но и со структурными изменениями компонентов внеклеточного матрикса.

Активность ЕК по отношению к опухолевым клеткам может служить показателем степени трансформированности клеток-мишеней. Полученные нами данные об уменьшении чувствительности трансформированных клеток к литической активности ЕК свидетельствуют о том, что антиоксидант НАС способен влиять на показатели иммунного статуса организма. Поиск основной мишени действия НАС в разработанной нами экспериментальной модели — наша дальнейшая задача.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 04-04-49186 и 06-48586).

Список литературы

- Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Влияние агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3Т3 и 3Т3-SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33.
- Гамалей И. А., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Комиссарчик Я. Ю., Хайтлина С. Ю. 2004. Инвазия бактерий в клетки 3Т3 и 3Т3-SV40, обработанные антиоксидантом. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 90 (8) : 430.
- Гамалей И. А., Полозов Ю. С., Аксенов Н. Д., Дариева З. А., Кирпичникова К. М., Поспелова Т. В. 2001. Клеточный цикл и образование активных форм кислорода в фибробластах грызунов. Цитология. 43 (6) : 595—601.
- Гончар И. В., Бузова Е. Б., Дорош В. Н., Гамалей И. А., Никольский Н. Н. 2003. Активация рецептора EGF и факторов STAT в зависимости от окислительно-восстановительного статуса клеток А431. Цитология. 45 (5) : 478—487.
- Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5) : 395—403.
- Мальгин А. М., Апреликова О. Н. 1982. Естественная противоопухолевая активность спленоцитов мышей СЗНА. Эксперим. онкол. 4 (3) : 37—39.
- Рыкова М. П., Спиранде И. В., Зедгендизе М. С., Ляхов В. В., Фукс Б. Б. 1981. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров. Иммунология. 1 : 88—90.

Aluigi M. G., De Flora S., D'Agostini F., Albini A., Fassina G. 2000. Antiapoptotic and antigenotoxic effects of N-acetylcysteine in human cells of endothelial origin. *Anticancer Res.* 20 : 3183—3187.

Chernysh S., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V. A., Filatova N. A., Anikin V. B., Platonov V. G., Bulet P. 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 12 628—12 632.

Hashimoto Y., Sudo E. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from ³H-uridine labeled cells. *Gann.* 62 : 139—145.

Kawakami S., Kageyama Y., Fujii Y., Kihara K., Oshima H. 2001. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on invasion and MMP-9 production of T24 human bladder cancer cells. *Anticancer Res.* 21 : 213—219.

Long E. O., Rajagopalan S. 2002. Stress signals activate natural killer cells. *J. Exp. Med.* 196 : 1399—1402.

Malori W., D'Ambrosio A., Rainaldi G., Rivabene R., Viora M. 1994. Thiol supplier N-acetylcysteine enhances conjugate formation between natural killer cells and K562 or U937 targets but increases the lytic function only against the latter. *Immunol. Lett.* 43 : 209—214.

Michaëlsson J., Teixeira de Matos C., Achour A., Lanier L. L., Karre K., Soderstrom K. 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med.* 196 : 1403—1414.

Moretta L., Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 23 : 255—259.

Nariai (Nakada) N., Kitagawa K., Nariai K., Kosaka T., Kuwabara M., Kiuchi Y. 2000. Active-oxygen involvement in canine NK-mediated cytotoxicity. *Vet. Med. Sci.* 62 : 457—460.

Rivabene R., Viora M., Matarrese P., Rainaldi G., D'Ambrosio A., Malorni W. 1995. N-acetylcysteine enhances cell adhesion properties of epithelial and lymphoid cells. *Cell Biol. Int.* 19 : 681—686.

Rubin H. 2001. Multistage carcinogenesis in cell culture. *Develop. Biol. (Basel).* 106 : 61—66.

Rubin H., Chow M., Yao A. 1996. Cellular aging, destabilization, and cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 1825—1830.

Spolarics Z., Wu J. X. 1997. Role of glutathione and catalase in H₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *Amer. J. Physiol.* 273 : G1304—G1311.

Van Kessel K. P., Van Strijp J. A., Van Kats-Renaud H. J., Miltenburg L. A., Van Der Tol M. E., Fluit A. C., Verhoef J. 1987. Further evidence against a role for toxic oxygen products as lytic agents in NK cell-mediated cytotoxicity. *Immunology.* 62 : 675—678.

Velge P., Bottreau E., Kaeffer B., Van-Langendonck N. 1995. The loss of contact inhibition and anchorage-dependent growth are key steps in the acquisition of *Listeria monocytogenes* susceptibility phenotype by non-phagocytic cells. *Biol. Cell.* 85 : 55—66.

Viora M., Quaranta M. G., Straface E., Vari R., Masella R., Malorni W. 2001. Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. *Immunology.* 104 : 431—438.

Walther M., Kaffenberger W., Van Beuningen D. 1999. Influence of clinically used antioxidants on radiation-induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 on HUVEC. *Int. J. Radiat. Biol.* 75 : 1317—1325.

Watzl B., Bub A., Briviba K., Rechkemmer G. 2003. Supplementation of a low-carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men. *Ann. Nutr. Metab.* 47 : 255—261.

Zafarullah M., Li W. Q., Sylvester J., Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *CMLS Cell Mol. Life Sci.* 60 : 6—20.

N-ACETYL-CYSTEINE REDUCES TRANSFORMED 3T3-SV40 FIBROBLAST SENSITIVITY
TO LYSIS BY NATURAL KILLER CELLS*N. A. Filatova, K. M. Kirpichnikova, I. A. Gamaley¹*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

We have shown that 18—20 h cultivation of transformed mouse fibroblasts 3T3-SV40 in the presence of antioxidant, N-acetylcysteine (NAC, 10 mM), did not change their sensitivity to lysis by natural killer (NK) mouse splenocytes. However, in 18—20 h after NAC removal 3T3-SV40 cells demonstrated resistance to NK cell activity. The cytotoxicity index (CI) was reduced up to 4.6 ± 2.4 % (in comparison with the control value 31.8 ± 2.4 %) approximating to the value in non-transformed 3T3 mouse fibroblasts. Normal 3T3 cells were resistant to NK action in all experimental conditions (CI varied within 0.7—5.3 %). These results show that NAC can induce partial reversion of transformed phenotype. We suggest that this effect may be due to the NAC-induced modifications of the cell surface and extracellular matrix proteins.

Key words: natural killers, N-acetylcysteine, cytotoxicity index, transformed fibroblasts 3T3-SV40.
