

## ДЕЙСТВИЕ АЛЬФА-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФИБРОБЛАСТЫ 3Т3 И 3Т3-SV40. СРАВНЕНИЕ С ДЕЙСТВИЕМ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА

© *Е. А. Вахромова, Ю. С. Полозов, К. М. Курпичникова,  
Н. Д. Аксенов, И. А. Гамалей*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,  
электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Исследовали влияние антиоксиданта  $\alpha$ -липоевой кислоты (ALA) в диапазоне концентраций 0.7—5.0 мМ на внутриклеточный уровень восстановленного глутатиона, характер распределения клеток по фазам клеточного цикла, структуру и организацию микрофиламентов и микротрубочек нормальных (3Т3) и трансформированных (3Т3-SV40) фибробластов. Показано, что ALA увеличивает содержание глутатиона в трансформированных клетках, но не меняет его уровень в нормальных клетках, останавливает клетки 3Т3 (но не клетки 3Т3-SV40) на границе фаз G<sub>1</sub>/S клеточного цикла и дезорганизует структуры актинового цитоскелета в клетках обоих типов. Действие ALA анализировали, сравнивая его с исследованным ранее действием другого антиоксиданта — N-ацетилцистеина (NAC). Совокупность полученных данных позволяет утверждать, что каждый из этих антиоксидантов имеет свои мишени в нормальных и трансформированных клетках и активирует разные сигнальные и метаболические пути в этих клетках. При этом промежуточные этапы действия ALA и NAC могут быть общими (изменение внутриклеточного уровня GSH, реорганизация актинового цитоскелета и др.).

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -липоевая кислота, N-ацетилцистеин, восстановленный глутатион, клеточный цикл, актиновые микрофиламенты, микротрубочки, фибробласты.

$\alpha$ -Липоевая кислота (ALA) является важным компонентом биологических мембран. Она защищает их от перекисного окисления липидов, играет существенную роль в митохондриальных дегидрогеназных реакциях, будучи кофактором таких ферментов, как пируватдегидрогеназа и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа (Holmquist et al., 2007). ALA легко усваивается из пищи и в клетках млекопитающих быстро восстанавливается до дигидролипоевой кислоты (DHLA), имеющей восстановленные SH-группы. В связи с этим она привлекает большое внимание как непрямой (метаболический) антиоксидант (Packer et al., 1995).

К специфическим антиоксидантным эффектам ALA и DHLA относят гашение и удаление из клетки активных форм кислорода (АФК), синглетного кислорода, гипохлорной кислоты, а также активных форм азота (Whiteman et al., 1996). ALA способна связывать ионы меди, цинка, железа, участвовать во внутриклеточном метаболизме витамина Е через взаимодействие с витамином С и глутатионом, индуцировать различные компоненты антиоксидантной системы клетки, главным образом глутатион (Packer et al., 1995), усиливая, таким образом, способность клеток удалять АФК и противостоять окислительному повреждению (Flier et al., 2002). Более того, ALA также действует как редокс-регулятор тиол-содержащих белков, таких как миоглобин, пролактин и тиоредоксин, а также транскрипционных факторов, например NF- $\kappa$ B и AP-1 (Sen, Packer, 1996; Mackenzie et al., 2006). Таким образом, она может влиять на проведение внутриклеточного сигнала и экспрессию ряда генов в условиях нормы и па-

тологии. Было показано, что ALA очень эффективна при лечении различных патологических состояний, характеризующихся окислительными повреждениями (Packer et al., 1995, 1997; Moreira et al., 2007). Однако необходимо учитывать и то, что в зависимости от концентрации пара ALA и DHLA может проявлять еще и прооксидантные свойства, восстанавливая внутриклеточное железо (Packer et al., 1995) и таким образом стимулируя продукцию супероксидного анион-радикала в митохондриях (Moini et al., 2002).

Ранее мы подробно исследовали влияние другого тиолсодержащего антиоксиданта — N-ацетилцистеина (NAC) — на следующие показатели активности нормальных и трансформированных фибробластов: внутриклеточный уровень глутатиона (Gamaley et al., 2006), распределение клеток по фазам клеточного цикла (Гамалей и др., 2003), организация и структура актинового цитоскелета (Ефремова и др., 2004), чувствительность клеток к бактериальной инвазии и литическому действию естественных киллерных клеток (Гамалей и др., 2006; Филатова и др., 2006). При этом была обнаружена уникальная способность NAC вызывать реверсию трансформированного фенотипа фибробластов 3Т3-SV40 (Гамалей и др., 2003, 2004, 2006; Ефремова и др., 2004; Филатова и др., 2006). Недавно мы показали, что ALA также способна уменьшать чувствительность трансформированных клеток 3Т3-SV40 к литической активности естественных киллерных клеток, хотя динамика этого изменения существенно отличается от действия NAC (Филатова и др., 2009).

В связи с этим задача настоящей работы состояла в изучении влияния ALA на те же параметры клетки, которые мы изучали, используя антиоксидант НАС. Мы исследовали влияние ALA на внутриклеточный уровень глутатиона, характер распределения клеток по фазам клеточного цикла, а также на структуру микрофиламентов и микротрубочек клеток с целью выявления различий и сходств в ответах клетки при действии этих двух антиоксидантов.

### Материал и методика

Объектами исследования служили эмбриональные мышечные фибробласты линии Balb/3T3 (клетки 3T3) и такие же фибробласты, трансформированные вирусом SV40 (клетки постоянной линии 3T3-SV40). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур ИИЦ РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки до образования монослоя. Антиоксидант ALA (Sigma, США) вводили в среду культивирования клеток до необходимой конечной концентрации (0.7—5.0 мМ) на 20 ч. После этого среду заменяли на свежую, не содержащую ALA, и культивировали клетки еще 24 ч. Контрольными служили клетки, не подвергавшиеся действию антиоксиданта. Плотность клеток при посеве составляла  $5 \cdot 10^5$  кл/мл. Эксперименты проводили на клетках, находящихся в экспоненциальной фазе роста.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла изучали методом проточной цитометрии. Клетки снимали с поверхности чашек Петри смесью растворов трипсина и Версена в соотношении 1 : 2, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0.02 % сапонины, и окрашивали в течение 30 мин при 37 °С в том же буферном растворе, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия и 250 мкг/мл рибонуклеазы. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на двухлазерном проточном цитометре-сортировщике ATC 3000 (Brucker) при скорости анализа 1000 клеток в 1 с. Численную обработку гистограмм (определение долей клеток, соответствующих по количеству ДНК фазам цикла  $G_0/G_1$ , S и  $G_2/M$ ) проводили согласно модели Дина (Dean, 1985). В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток.

Концентрацию глутатиона (GSH) в клетках оценивали колориметрически по изменению оптической плотности при длине волны 565 нм. Метод основан на реакции вытеснения GSH (содержащегося в супернатанте лизированных клеток) аминазина из цветного комплекса с хлоридом палладия в кислой среде (Lee, Tan, 1974).

Для визуализации актинового цитоскелета клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида в течение 15 мин, трижды промывали PBS, обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин и окрашивали фаллоидином-TRITC (Sigma, США) при 37 °С в течение 10 мин. Микроскопирование полученных препаратов производили на микроскопе Axioscop (Германия), возбуждая и регистрируя флуоресценцию светом с длинами волн 540 и 590 нм соответственно. Использовали объективы 100×.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на тубулин. Клетки, посеянные на покровные стекла, фиксировали 3.7%-ным раствором параформаль-

дегида в течение 15 мин, трижды промывали PBS и обрабатывали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 в течение 15 мин. Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией клеток в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первыми (моноклональными мышечными) антителами против  $\alpha$ -тубулина (Sigma, США) в разведении 1 : 2000 в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего клетки промывали 0.1%-ным раствором Tween 20 (BioRad) 3 раза по 5 мин и инкубировали 30 мин при 37 °С со вторыми антителами (козлиными к мышечному IgG, конъюгированными с ФИТЦ, Oregon Green 488; Molecular Probes, США; разведение 1 : 100). После этого стекла отмывали от избытка антител 0.1%-ным раствором Tween 20 и монтировали на обезжиренные предметные стекла в среду Vectashield (Vector Laboratories). Микроскопирование полученных препаратов производили на конфокальном флуоресцентном сканирующем микроскопе Leica TCS SL. Использовали объектив HCX PLAPO CS 63×/1.32. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Adobe Photoshop CS2.

### Результаты

Влияние ALA на содержание GSH. Клетки 3T3 оказались менее чувствительными к действию ALA, чем трансформированные клетки 3T3-SV40. При добавлении ALA к клеткам 3T3 наблюдали тенденцию к увеличению внутриклеточного уровня GSH, хотя нам и не удалось получить достоверные изменения этого параметра в диапазоне всех испытанных концентраций ALA (0.7—5.0 мМ). Так, например, изменение внутриклеточной концентрации GSH при 20-часовом действии 1.5 мМ ALA составило 109 % ( $5.90 \pm 1.18$  ммоль на 1 млн клеток). В свою очередь присутствие ALA в среде культивирования трансформированных клеток 3T3-SV40 приводило к значительному увеличению внутриклеточного уровня GSH, причем эти изменения были тем больше, чем больше была концентрация агента. Однако выявить четкую концентрационную зависимость не удалось из-за большого разброса данных, что, по-видимому, является причиной высокой чувствительности клеток к ALA, легко вызывающей прооксидантное действие (Packer et al., 1995; Moini et al., 2002). Нередко в наших экспериментах

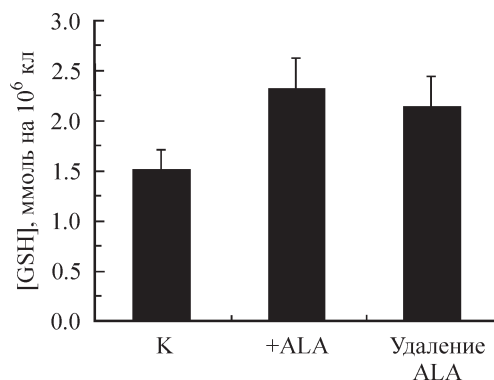


Рис. 1. Изменение содержания восстановленного глутатиона (GSH) в клетках 3T3-SV40 через 20 ч после введения в среду культивирования 1.5 мМ  $\alpha$ -липоевой кислоты (ALA) и через 20 ч после ее удаления сменой среды. К — контроль.

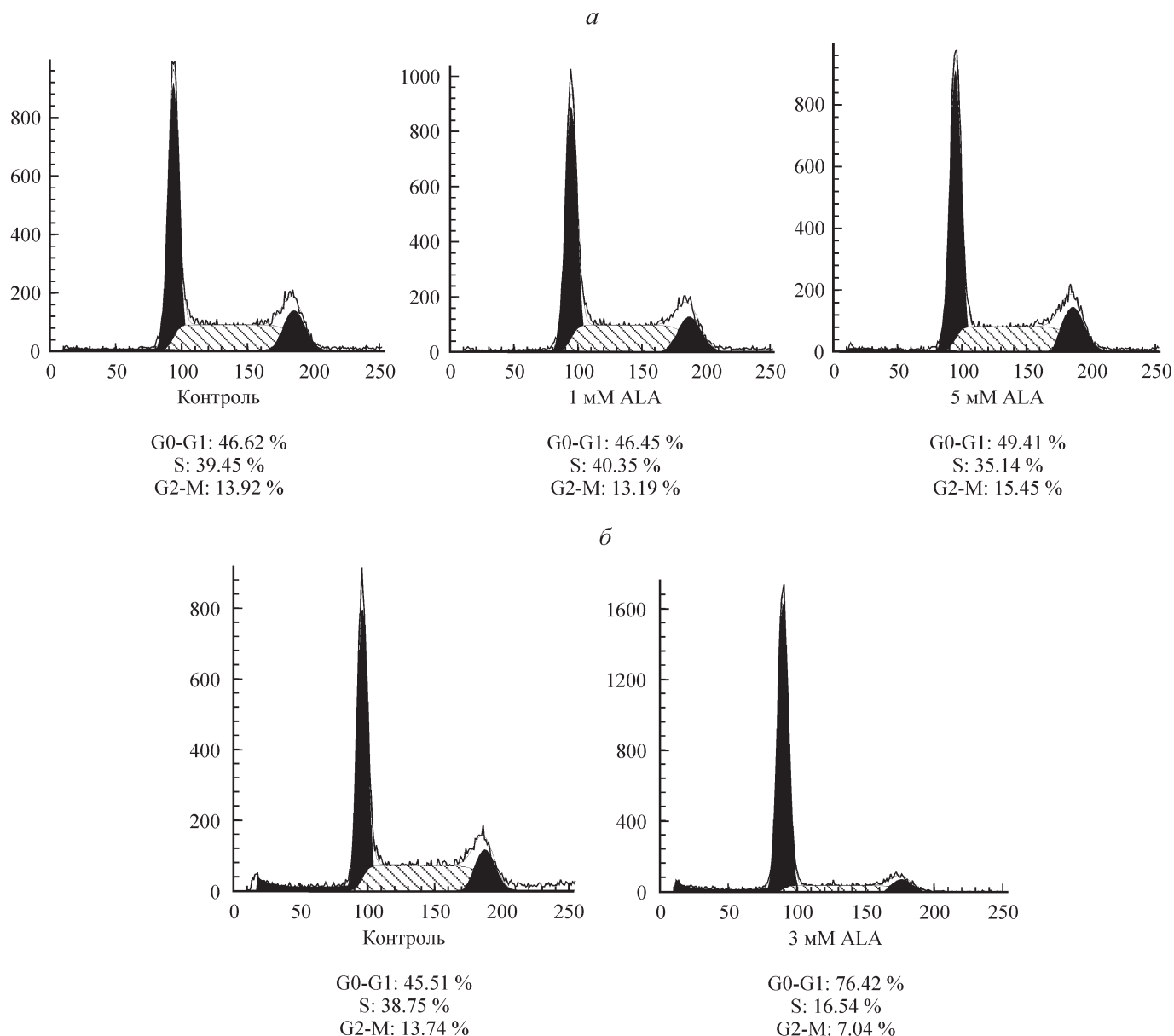


Рис. 2. Распределение клеток 3T3-SV40 (*a*) и клеток 3T3 (*б*) по фазам клеточного цикла в контрольных условиях и в среде, содержащей антиоксидант ALA.

По горизонтали — содержание ДНК, усл. ед.; по вертикали — число клеток. Клетки культивировали в условиях голодания (0.5 % сыворотки) в течение 2 сут, затем среду заменяли на свежую, содержащую 10 % сыворотки; через 1 сут к экспериментальным клеткам добавляли ALA в конечной концентрации 1, 3 или 5 мМ, а к контрольным клеткам — такое же количество 0.9%-ного NaCl; еще через 1 сут оценивали распределение всех клеток по фазам клеточного цикла.

ALA в высоких концентрациях (3—5 мМ) вызывала повреждение и гибель клеток. Возможно, это зависело от их исходного состояния (в разных посевах и пассажах). Поэтому не во всех экспериментах нам удалось получить результаты с действием ALA в высоких концентрациях. Никогда не возникало повреждений при действии ALA в концентрации до 1.5 мМ. Мы получили, что в присутствии 1.5 мМ ALA содержание GSH в клетках 3T3-SV40 за 20 ч увеличивается на 54 % по сравнению с контролем и составляет  $2.30 \pm 0.26$  ммоль на 1 млн клеток (против  $1.5 \pm 0.2$  в контроле). Удаление ALA из среды культивирования клеток не приводит к быстрому падению внутриклеточного уровня GSH; в течение 1 сут он остается повышенным до 140 % (рис. 1). В отличие от ALA NAC, как мы установили ранее, повышает содержание GSH не

только в трансформированных, но и в нормальных клетках; а удаление NAC из среды культивирования приводит к резкому падению уровня GSH до контрольного значения в клетках обоих типов (Gamaley et al., 2006).

Влияние ALA на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Оказалось, что ALA в диапазоне концентраций 1—5 мМ не влияет на прохождение клеток 3T3-SV40 по фазам клеточного цикла. Как видно на рис. 2, *a*, доля клеток в каждой из фаз цикла (G<sub>1</sub>, S и G<sub>2</sub>/M) остается постоянной. Иначе реагировали на введение антиоксиданта ALA нетрансформированные клетки 3T3. Оказалось, что ALA, как и NAC (Гамалей и др., 2003), способна останавливать клетки на границе фаз G<sub>1</sub>/S, причем дозозависимо. Так, в присутствии 3 мМ ALA доля клеток, находящихся в S-фазе, составляет

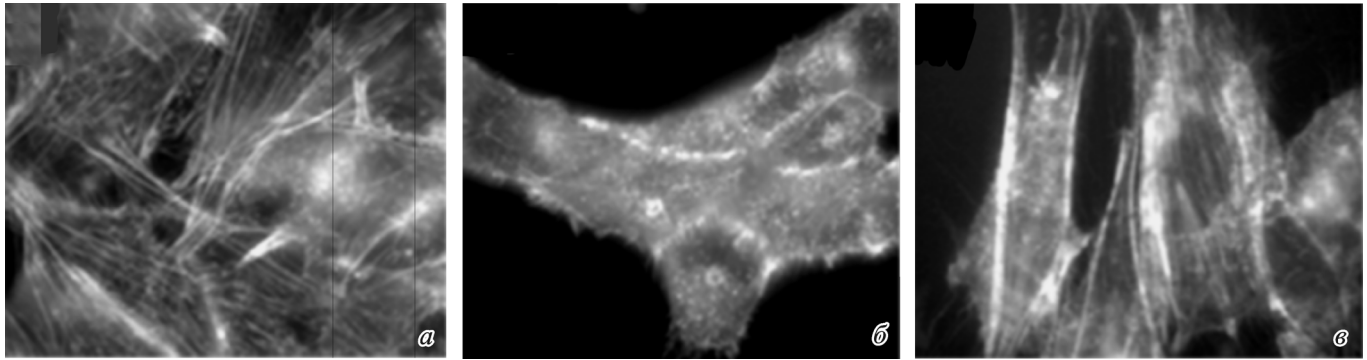


Рис. 3. Реорганизация актинового цитоскелета мышечных фибробластов 3Т3-SV40 после введения в среду культивирования (б) и через 24 ч после удаления из нее (в) ALA в концентрации 1.25 мМ.

а — актиновые филаменты в контрольных клетках. Окраска родамин-фаллоидином. Об. 100×.

16.54 % против 38.75 % в контроле (рис. 2, б). После удаления ALA клеточный цикл возобновляется (не показано).

Структура цитоскелета в присутствии ALA. Обработка клеток обоих типов ALA приводит к разрушению клеточного монослоя, изменению формы клеток и реорганизации актинового цитоскелета. В присутствии ALA в течение примерно 6—10 ч актиновые филаменты разбираются, в клетках появляются крупные скопления аморфного актина. Степень разборки и время действия зависят от концентрации агента. На рис. 3 показана реорганизация микрофиламентов в клетках 3Т3-SV40 в присутствии 1.25 мМ ALA. Таким образом, действие ALA в этом случае не отличается от действия NAC (Ефремова и др., 2004). После удаления агента из среды культивирования клеток структура актинового цитоскелета постепенно восстанавливается в течение 8—24 ч и не отличается от контрольной (рис. 3, а, в) в отличие от ситуации с удалением NAC (Ефремова и др., 2004). Аналогичные изменения в клетках 3Т3 не показаны. Кроме этого, мы исследовали организацию системы микротрубочек в клетках 3Т3 и 3Т3-SV40 при их обработке ALA. Мы не обнаружили никаких видимых изменений структуры этих элементов цитоскелета ни в присутствии ALA, ни после ее удаления из среды культивирования клеток. Результаты экспериментов с клетками 3Т3-SV40 показаны на рис. 4. Аналогичные результаты были получены и при действии на клетки NAC (не показано). Тем не менее в некоторых случаях после удаления ALA было за-

метно некоторое усиление интенсивности свечения антител против  $\alpha$ -тубулина по сравнению с контрольными клетками или клетками в присутствии ALA. Таким образом, ALA вызывает явные и хорошо выраженные изменения лишь в структуре актинового цитоскелета.

### Обсуждение

Итак, мы изучали действие ALA как антиоксиданта на фибробласты 3Т3 и их трансформанты 3Т3-SV40, сравнивая его с исследованным ранее действием антиоксиданта NAC. Действие на клетку ALA, как и NAC, увеличивает количество восстановленных SH-групп, но в отличие от NAC прямого отношения к синтезу GSH не имеет. Тем не менее в силу взаимозависимости метаболизма и содержания разных восстанавливающих эквивалентов в клетке (Packer et al., 1995) ALA способна повышать внутриклеточный уровень GSH *in vivo* и *in vitro* (Busse et al., 1992; Eremeeva, Silverman, 1998; Mervaala et al., 2003). Наши эксперименты показали, что ALA повышает содержание GSH только в трансформированных фибробластах 3Т3-SV40 и не имеет выраженного влияния на его уровень в клетках 3Т3. По нашему мнению, это говорит о принципиально разном действии ALA на метаболические пути в клетках 3Т3 и их трансформантах 3Т3-SV40. В то же время в других клетках ALA увеличивает содержание GSH на 50 % (ткани нормального легкого), а в опухолевых клетках нейробластомы и меланомы — на 30—70 % (Busse et al., 1992).

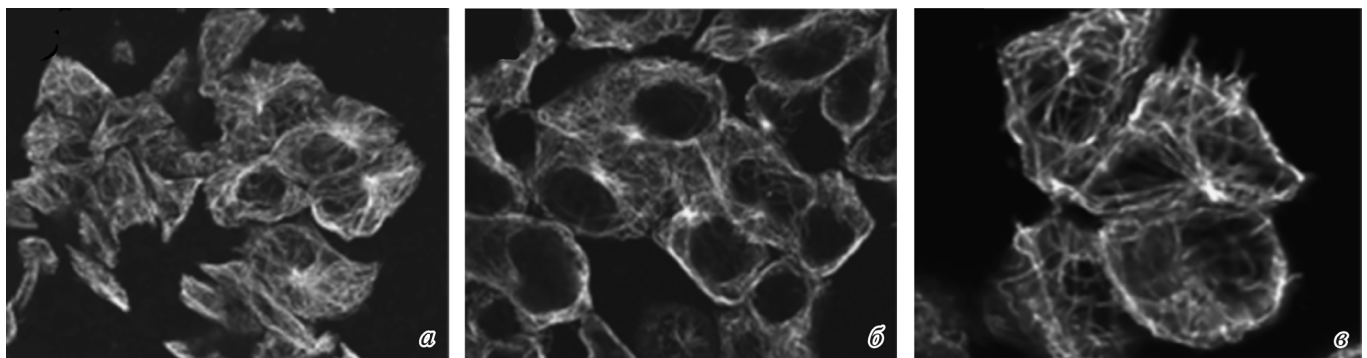


Рис. 4. Организация микротрубочек мышечных фибробластов 3Т3-SV40 в присутствии 1.25 мМ ALA (б) и через 24 ч после ее удаления (в).

а — в контрольных клетках. Иммунофлуоресцентная окраска на  $\alpha$ -тубулин. Об. 63×.



Одним из физиологических показателей действия различных антиоксидантов на клетки является остановка или замедление прохождения клеток по фазам клеточного цикла. Тем не менее в наших экспериментах ALA в отличие от NAC вплоть до концентрации 5 мМ не замедляла прохождение по циклу клеток 3T3-SV40, но замедляла или останавливала клетки 3T3 на границе фаз  $G_1/S$  в зависимости от концентрации. Аналогичные результаты были получены на нормальных первичных фибробластах человека, равно как и на клетках линии Balb/c-3T3, при их обработке ALA в диапазоне концентраций 1—5 мМ (Van de Mark et al., 2003). Авторы объясняют остановку этих клеток в фазе  $G_1$  цикла увеличением в них уровня циклинзависимого киназного ингибитора p27Kip. Есть данные и о том, что ALA (2.5—5.0 мМ) вызывает остановку роста, супрессию пролиферации и индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток лейкемии человека HL-60. В этом случае нарушение прохождения границ фаз  $G_1/S$  и  $G_2/M$  клеточного цикла, вызванное действием антиоксиданта, связывают с уменьшением внутриклеточных уровней циклина E/cdk2 и циклина B1/cdk1 (Selvakumar, Hsieh, 2008). Перераспределение трансформированных клеток по фазам цикла вследствие замедления его прохождения было получено нами ранее при использовании NAC (Гамалей и др., 2003). Увеличение концентрации NAC, как и ALA, оказывает на клетки повреждающее действие и может индуцировать апоптоз. Данные литературы указывают на то, что блок клеточного цикла у трансформированных фибробластов (линии NIH3T3) при действии 20 мМ NAC может быть следствием частичного ингибирования MAP-киназного каскада и ингибирования экспрессии D1 — циклина ранней фазы  $G_1$  (Sekharam et al., 1998). Таким образом, на основании наших результатов и данных других исследователей можно заключить, что антиоксиданты ALA и NAC действуют на разные сигнальные белки, ответственные за переход клеток в фазы S и  $G_2/M$ . Кроме того, действие ALA на нормальные и трансформированные клетки различно и, следовательно, затрагивает разные сигнальные пути в этих и других клетках. Подтверждением этого является и кажущееся противоречие между влиянием ALA на прохождение клеток по циклу в наших экспериментах (с трансформированными фибробластами 3T3-SV40) и в экспериментах с опухолевыми клетками (Busse et al., 1992; Selvakumar, Hsieh, 2008). Таким образом, нам не удалось выявить четкую корреляцию между изменением внутриклеточного уровня GSH и прохождением клеток по фазам клеточного цикла в присутствии ALA.

Многочисленные данные указывают на возможность регуляции состояния микрофиламентов и микротрубочек посредством окисления (восстановления) или глутатионилирования как структурных, так и вспомогательных белков цитоскелета (Luduena, Roach, 1991; Gibson et al., 1998; Milzani et al., 2000; Wang et al., 2001; Dalle-Donne et al., 2003). Установлено, что перестройки актинового цитоскелета могут контролироваться малой ГТФазой *rac1*, входящей в состав ферментного комплекса NADPH—оксидаза (Moldovan et al., 2000). В свою очередь дезорганизация микротрубочек в условиях окислительного стресса считается результатом дефосфорилирования *tau*-белков (Landino et al., 2004; Aquilano et al., 2008).

При действии ALA на клетки 3T3 и 3T3-SV40 мы получили изменения структуры актинового цитоскелета, аналогичные тем, которые вызывал NAC (Ефремова и др., 2004; Филатова и др., 2008). Однако удаление ALA (в отличие от NAC) из среды культивирования к реверсии фе-

нотипа клеток 3T3-SV40 не приводило: вновь собранные микрофиламенты не отличались от контрольных, а сами клетки возвращали потерянную в присутствии ALA чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток (Филатова и др., 2009). Поэтому можно утверждать, что пути реорганизации микрофиламентов при действии ALA и NAC и после их удаления из среды культивирования разные. Поскольку ALA изменяет уровень GSH только в клетках 3T3-SV40, а реорганизует структуру актиновых микрофиламентов и в этих клетках, и в клетках 3T3, опять можно говорить об отсутствии прямой зависимости между окислительно-восстановительным балансом клетки и структурой цитоскелета.

В настоящее время считается, что хотя микротрубочки и являются самыми жесткими элементами цитоскелета, относительно хрупки и более подвержены разборке, нежели микрофиламенты или промежуточные филаменты, о чем свидетельствует ряд данных (Algül et al., 2002; Banan et al., 2002; Харченко и др., 2007). Именно поэтому обнаруженное нами постоянство структуры микротрубочек в клетках обоих типов при действии ALA и NAC, возможно, объясняется методическими недостатками. Однако оценивать изменения пространственной организации тубулярной сети сложно еще и потому, что в клетках одного и того же типа возможны различные варианты расположения микротрубочек (радиальное или хаотичное), о чем свидетельствуют не только наши наблюдения, но и данные литературы (Усова и др., 2008). Кроме того, само нарушение архитектуры микротубулярной сети может не влиять на жизнеспособность и функциональную активность клеток (Усова и др., 2008). Оценивать возможные количественные изменения  $\alpha$ -тубулина (т. е. изменение интенсивности свечения антител в присутствии ALA) в нашу задачу не входило.

Итак, на основании проведенного нами исследования ряда морфологических и физиологических характеристик нормальных и трансформированных клеток при их обработке ALA можно сделать следующий вывод: нормальные (3T3) и трансформированные (3T3-SV40) клетки имеют разные мишени, воспринимающие действие ALA, в результате чего активируются разные сигнальные пути, вызывающие разные ответы клеток на молекулярном и физиологическом уровнях. Ранее мы пришли к этому же заключению, рассматривая действие другого антиоксиданта — NAC (Гамалей и др., 2003; Филатова и др., 2009). Совокупность полученных нами данных по действию NAC и ALA позволяет утверждать, что каждый из этих антиоксидантов имеет свои мишени в нормальных и трансформированных клетках, а следовательно, активирует разные сигнальные и метаболические пути в этих клетках. При этом промежуточные этапы действия NAC и ALA могут быть общими (изменение внутриклеточного уровня GSH, реорганизация актинового цитоскелета и др.).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00467), программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Государственного контракта № 02.740.11.0094.

#### 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 3T3 и 3T3SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1) : 26—33.

Гамалей И. А., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Комиссарчик Я. Ю., Кевер Л. В., Полозов Ю. С., Хайтлина С. Ю. 2006. Уменьшение чувствительности трансформированных клеток 3T3-SV40, обработанных N-ацетилцистеином, к бактериальной инвазии. Бюл. эксперим. биол. мед. 142 (7) : 101—105.

Гамалей И. А., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Комиссарчик Я. Ю., Хайтлина С. Ю. 2004. Инвазия бактерий в клетки 3T3 и 3T3SV40, обработанные антиоксидантом. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 90 (8) : 430.

Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3T3 и 3T4-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5) : 395—403.

Усова Е. В., Бураков А. В., Шильман А. А., Надеждина Е. С. 2008. Нарушение радиальной системы интерфазных микротрубочек при избытке сыворотки в среде культивирования клеток. Биофизика. 53 (6) : 972—977.

Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Вахромова Е. А., Гамалей И. А. 2009. Влияние альфа-липоевой кислоты на чувствительность трансформированных фибробластов к литической активности естественных киллерных клеток. Сравнение с действием НАС. Цитология. 51 (5) : 398—402.

Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3T3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.

Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2008. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3T3-SV40 и их чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток. Цитология. 50 (3) : 261—267.

Харченко М. В., Корнилова Е. С., Меликова М. С. 2007. Изменения организации системы микротрубочек в ходе эндцитоза рецептора ЭФР. Цитология. 49 (3) : 243—249.

Algül H., Tando Y., Beil M., Weber C. K., Von Weyhern C., Schneider G., Adler G., Schmid R. M. 2002. Different modes of NF-kappaB/Rel activation in pancreatic lobules. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283 (2) : G270—G281.

Aquilano K., Vigilanza P., Filomeni G., Rotilio G., Cirio M. R. 2008. Tau dephosphorylation and microfilaments disruption are upstream events of the anti-proliferative effects of DADS in SH-SY5Y cells. J. Cell. Mol. Med. (Epub. 2008. Nov. 14).

Banan A., Zhang L., Fields J. Z., Farhadi A., Talmage D. A., Keshavarzian A. 2002. PKC- $\zeta$  prevents oxidant induced iNOS upregulation and protects the microtubules and gut barrier integrity. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283 : G909—G922.

Busse E., Zimmer G., Schopohl B., Kornhuber B. 1992. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione *in vitro* and *in vivo*. Arzneimittelforschung. 42 (6) : 829—831.

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R., Milzani A. 2003. Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulfide exchange mechanism. Free Radic. Biol. Med. 35 : 1185—1193.

Dean P. N. 1985. Methods of data analysis in flow cytometry. In: Flow cytometry-instrumentation and data analysis. New York: Acad. Press. 114—124.

Eremeeva M. E., Silverman D. J. 1998. Effects of the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid on human umbilical vein endothelial cells infected with *Rickettsia rickettsii*. Infect. Immun. 66 (5) : 2290—2299.

Flier J., Van Muiswinkel F. L., Jongenelen C. A., Drukarch B. 2002. The neuroprotective antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid induces detoxication enzymes in cultured astroglial cells. Free Radic. Res. 36 : 695—699.

Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Keвер L., Komissarshchik Y., Polozov Yu., Khaitlina S. 2006. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell. Biol. Int. 30 : 319—325.

Gibson X. A., Shartava A., McIntyre J., Monteiro C. A., Zhang Y., Shah A., Campbell N. F., Goodman S. R. 1998. The efficacy of reducing agents or antioxidants in blocking the formation of dense cells and irreversibly sickled cells *in vitro*. Blood. 91 : 4373—4378.

Holmquist L., Stuchbury G., Berbaum K., Muscat S., Young S., Hager K., Engel J., Münch G. 2007. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. Pharmacol. Ther. 113 (1) : 154—164.

Landino L. M., Skreslet T. E., Alston J. A. 2004. Modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system. J. Biol. Chem. 279 (33) : 35 101—35 105.

Lee K. T., Tan I. K. 1974. A new colorimetric method for the determination of glutathione in erythrocytes. Clin. Chim. Acta. 53 : 153—161.

Ludwena R. F., Roach M. C. 1991. Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimetabolic and antimicrotubule agents. Pharmacol. Ther. 49 (1—2) : 133—152.

Mackenzie G. G., Zago M. P., Erlejan A. G., Aimo L., Keen C. L., Oteiza P. I. 2006. Alpha-lipoic acid and N-acetyl cysteine prevent zinc deficiency-induced activation of NF-kappaB and AP-1 transcription factors in human neuroblastoma IMR-32 cells. Free Radic. Res. 40 (1) : 75—84.

Mervaala E., Finckenberg P., Lapatto R., Müller D. N., Park J. K., Dechend R., Ganten D., Vapaatalo H., Luft F. C. 2003. Lipoic acid supplementation prevents angiotensin II-induced renal injury. Kidney Int. 64 (2) : 501—508.

Milzani A., Rossi R., Di Simplicio P. 2000. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. Protein Sci. 9 : 1774—1782.

Moini H., Packer L., Saris N.E. 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Toxicol. Appl. Pharmacol. 182 (1) : 84—90.

Moldovan L., Moldovan N. I., Sohn R. H., Parikh S. A., Goldschmidt-Clermont P. J. 2000. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. Circ. Res. 86 : 549—557.

Moreira P. I., Harris P. L., Zhu X., Santos M. S., Oliveira C. R., Smith M. A., Perry G. 2007. Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. J. Alzheimers Dis. 12 (2) : 195—206.

Packer L., Tritschler H. J., Wessel K. 1997. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. Free Radic. Biol. Med. 22 : 359—378.

Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic. Biol. Med. 19 (2) : 227—250.

Sekharam M., Trotti A., Cunnick J. M., Wu J. 1998. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G<sub>1</sub> phase by N-acetylcysteine. Toxicol. Appl. Pharmacol. 149 : 210—216.

Selvakumar E., Hsieh T. C. 2008. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by lipoic acid: role in cancer prevention and therapy. J. Hematol. Oncol. 30 (1) : 4.

Sen C. K., Packer L. 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J. 10 : 709—720.

Van de Mark K., Chen J. S., Steliou K., Perrine S. P., Faller D. V. 2003.  $\alpha$ -Lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. J. Cell. Physiol. 194 : 325—340.

Wang J., Boja E. S., Tan W., Tekle E., Fales H. M., English S., Miesal J. J., Chock P. B. 2001. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. J. Biol. Chem. 276 : 47 763—47 766.

Whiteman M., Tritschler H., Halliwell B. 1996. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and  $\alpha_1$ -antitrypsinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid. FEBS Lett. 379 : 74—76.

EFFECT OF ALPHA-LIPOIC ACID ON FIBROBLASTS 3T3 AND 3T3-SV40.  
COMPARISON WITH N-ACETYLCYSTEINE ACTION

*E. A. Vakhromova, Y. S. Polozov, K. M. Kirpichnikova, N. D. Aksenov, I. A. Gamaley*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

In this study we investigated the effect of alpha-lipoic acid (ALA) in concentration range 0.7—5.0 mM on the intracellular level of reduced glutathione, the cell cycle phase distribution, the structure of microfilaments and microtubules of normal (3T3) and transformed (3T3-SV40) fibroblasts. We obtained that ALA increased the glutathione content in transformed cells, but did not change its level in normal cells, induced cell cycle arrest of 3T3 cells (but not 3T3-SV40 cells), and disrupted actin microfilaments in cells of both lines. The effect of ALA was compared with N-acetylcysteine (NAC) action. The whole complex of findings allows us to affirm that each of these antioxidants acts on its own target molecules in normal and transformed cells and activates different signal and metabolic pathways in these cells. But at the same time the intermediate steps of ALA and NAC action can be common (alteration of the intracellular level of glutathione, reorganization of actin cytoskeleton, etc.).

Key words: alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine, reduced glutathione, cell cycle, actin microfilaments, microtubules, fibroblasts.

---