

**ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ К ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК.
СРАВНЕНИЕ С ДЕЙСТВИЕМ NAC**

© *Н. А. Филатова, К. М. Кирпичникова, Е. А. Вахромова, И. А. Гамалей*¹

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Сравнивается влияние двух антиоксидантов — альфа-липоевой кислоты (ALA) и N-ацетилцистеина (NAC) — на чувствительность трансформированных мышечных фибробластов 3T3-SV40 к литической активности естественных киллерных клеток (ЕКК) — спленоцитов мышей. В отличие от NAC (10 мМ), присутствие которого не влияет на чувствительность фибробластов к действию ЕКК, ALA (1.25 мМ) значительно снижает ее в течение нескольких часов. Удаление антиоксиданта из среды культивирования клеток приводит в одном случае к постепенному восстановлению чувствительности (ALA), а в другом — к полной ее потере (NAC). Выключение активности желатиназы ММП-2 (матриксной металлопротеиназы) в присутствии ингибитора GM6001 или специфических антител приводит к результату, подобному действию ALA, но не NAC, — падению чувствительности фибробластов 3T3-SV40 к активности ЕКК. Инактивация ММП ЕКК не влияла на их литическую активность в отношении клеток 3T3-SV40. Результаты свидетельствуют о том, что прямой антиоксидант NAC (имеющий восстановленные SH-группы) и непрямой ALA (восстанавливает SH-группы и действует как прямой антиоксидант только внутри клетки) активируют принципиально различные внутриклеточные сигнальные пути, хотя оба они включают в себя инактивацию ММП-2.

Ключевые слова: альфа-липоевая кислота, N-ацетилцистеин, трансформированные фибробласты, цитотоксическая активность, естественные киллерные клетки, матриксные металлопротеиназы.

Принятые сокращения: ЕКК — естественные киллерные клетки, ММП — матриксные металлопротеиназы, ЦИ — цитотоксический индекс, ALA — альфа-липоевая кислота, NAC — N-ацетилцистеин.

Иммунный статус организма оценивается по целому ряду показателей, в том числе по литической активности естественных киллерных клеток (ЕКК). ЕКК — это несенсибилизированные большие гранулярные лимфоциты, осуществляющие не зависящий от антител и комплемента лизис широкого спектра клеток-мишеней (опухолевых, зараженных вирусами и некоторых других) и поэтому играющие важную роль в иммунном надзоре за состоянием клеточной пролиферации, цитодифференцировки и других процессов (см. обзоры: Moretta et al., 2002; Moretta, Moretta, 2004; Andoniou et al., 2006).

В литературе есть немногочисленные, в основном давние и весьма противоречивые, данные, свидетельствующие о попытках понять и определить зависимость взаимоотношений ЕКК с клетками-мишенями от их редокс-состояния, т. е. от баланса между их окисляющими (активными формами кислорода) и восстанавливающими (антиоксидантами) эквивалентами. Эксперименты (in vivo и in vitro), описывающие влияние антиоксидантов на разные показатели иммунного статуса организма, позволяют сделать лишь самый общий вывод о необходимости определенного редокс-баланса для поддержания гомеостаза иммунной системы (Suthanthiran et al., 1984;

Duwe et al., 1985; Van Kessel et al., 1987; Malori et al., 1994; Nariai (Nakada) et al., 2000; Viora et al., 2001; Watzl et al., 2003).

Изучая влияние тиоловых антиоксидантов (N-ацетилцистеина — NAC и глутатиона) на разные параметры клеточной активности, мы показали, что длительное действие этого антиоксиданта приводит к частичной временной реверсии трансформированного фенотипа фибробластов 3T3-SV40. Реверсия выражается в том, что после действия NAC трансформированные фибробласты 3T3-SV40, меняя свою морфологию, приобретают устойчивость к бактериальной инвазии и к литической активности ЕКК. Это делает их похожими на нормальные фибробласты 3T3 (Филатова и др., 2006, 2008; Gamaley et al., 2006). NAC, проникая в клетки, служит предшественником синтеза глутатиона, основного компонента восстановительного буфера в клетке, что является основой его применения как антиоксиданта. Однако мы не обнаружили прямой корреляции между увеличением содержания глутатиона в клетках 3T3-SV40 и потерей ими чувствительности к действию бактерий или ЕКК (Gamaley et al., 2006). Это говорило о том, что мишенью действия прямого антиоксиданта NAC (имеющего восстановленные

SH-группы) может быть не только синтез глутатиона, но и какие-то сигнальные молекулы во внеклеточном матриксе или на поверхности клетки. А молекулярная реорганизация поверхностной мембраны может быть критичной для взаимодействия клеток-мишеней и ЕКК (Davis et al., 1999; Almedia, Davis, 2006).

Задача настоящей работы заключалась в исследовании влияния другого антиоксиданта — альфа-липоевой кислоты (ALA) — на чувствительность мышинных фибробластов 3T3-SV40 к литическому действию ЕКК (спленоцитов мышей). ALA в отличие от NAC аналогично окисленному глутатиону не имеет восстановленных SH-групп, но легко восстанавливает их, быстро проникая в клетки и действуя как восстановленный антиоксидант (дигидролипоевая кислота) только изнутри клетки (Packer et al., 1995; Sen, Packer, 2000; Moini et al., 2002). Поэтому в настоящей работе сравнивается действие прямого антиоксиданта NAC и метаболического ALA.

Материал и методика

Клетками-мишенями служили эмбриональные мышинные фибробласты линии Balb/3T3 (клетки 3T3) и такие же фибробласты, трансформированные вирусом SV 40 (клетки 3T3-SV40). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур ИНИЦ РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. Антиоксидант NAC или ALA (Sigma, США) вводили в среду культивирования клеток до конечных концентраций соответственно 10 и 1.25 мМ на 20 ч. Затем среду заменяли на свежую, не содержащую антиоксиданта, и культивировали еще 24 ч.

Клетки-эффекторы выделяли из селезенки интактных мышей-самцов линии СЗНА массой 18–20 г, полученных из питомника «Рапполово» РАН (Санкт-Петербург). 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, антиоксиданта или иных агентов. Соотношение эффекторов и мишеней составляло 20 : 1. Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в %.

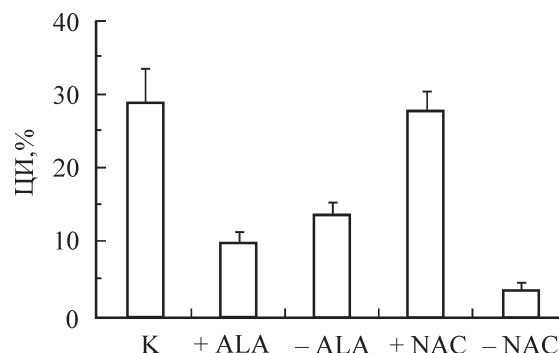
Для уменьшения активности матриксных металлопротеиназ (ММП) использовали ингибитор ММП GM6001 (или Pomastat; Calbiochem, Германия) и мышинные моноклональные антитела против ММП-2 и ММП-9 человека (Chemicon Int Co., США; номера по каталогу соответственно MAB13407 и MAB13416). Согласно характеристике фирмы-производителя, антитела распознают и латентную, и активную формы обеих ММП. ЦИ определяли через 1 ч после связывания ММП антителами (разведение 1 : 1000), а также через 2, 4 и 20 ч после действия ингибитора GM6001. Дополнительно ЦИ определяли через 24 ч после удаления ингибитора с помощью смены среды.

Результаты и обсуждение

Трансформированные клетки 3T3-SV40 оказались чрезвычайно чувствительными к действию липоевой кислоты, которая легко приводила их к гибели. Поэтому подбор ее концентрации, в присутствии которой клетки могли долго сохранять жизнеспособность, оказался трудным. По всей вероятности, это относится к клеткам разных типов, поскольку, по данным из литературы, используемые концентрации ALA варьируют в очень широком диапазоне — от 0.5 до 10 мМ (Packer et al., 1995; Sen, Packer, 2000; Moini et al., 2002). Для клеток 3T3-SV40 мы остановились на концентрации 1.25 мМ, при которой никогда не наблюдали гибели клеток. NAC, как и ранее, использовали в концентрации 10 мМ (Филатова и др., 2006, 2008).

У клеток 3T3-SV40, обработанных 1.25 мМ ALA в течение 20 ч, чувствительность к действию ЕКК уменьшалась в отличие от случая с NAC (см. рисунок). Однако уже через 1 сут после изъятия этого антиоксиданта из среды культивирования эта чувствительность начинала увеличиваться, тогда как в случае с NAC она почти исчезала и становилась сходной с этой же чувствительностью нормальных клеток 3T3 (значение их ЦИ варьирует от 0 до 2) (Филатова и др., 2006, 2008). Таким образом, действие ALA в отличие от NAC способно уменьшить, но не лишить клетки 3T3-SV40 чувствительности к литическому действию ЕКК. Это говорит о том, что эти два антиоксиданта действуют на разные сигнальные пути клетки, начинающиеся в случае с NAC вне клетки, а в случае с ALA, возможно, только внутри нее.

В предыдущей работе (Воронкина и др., 2008) в поисках мишени быстрого реагирования на введение антиоксиданта мы исследовали активность ММП — ферментов, разрушающих матрикс, способных гидролизовать почти все компоненты внеклеточного матрикса, встречающиеся в соединительных тканях (см. обзоры: Westermarck, Kähäri, 1999; Mott, Werb, 2004). ММП образуются из неактивных предшественников, которые превращаются в активные протеиназы и секретируются клеткой во внеклеточную среду под воздействием различных клеточ-



Изменение чувствительности трансформированных фибробластов 3T3-SV40, обработанных антиоксидантом ALA (1.25 мМ) или NAC (10 мМ), к литическому действию естественных киллерных клеток.

Цитотоксический индекс (ЦИ) определяли через 20 ч после введения антиоксиданта в среду культивирования, а затем через 24 ч после его удаления сменой среды. Для каждого случая даны средние значения ЦИ из 12–18 измерений в 3 экспериментах. К — контроль.

Т а б л и ц а 1

**Активность спленоцитов мышей СЗНА
в отношении клеток 3Т3-SV40, обработанных ингибитором
матриксных металлопротеиназ GM6001 (GM)**

Концентрация GM и время действия	ЦИ (%) в присутствии GM	ЦИ (%) через 24 ч после удаления GM
0 (контроль)	36.5 ± 1.2	
0.5 нМ, 4 ч	16.0 ± 3.2	3.9 ± 0.8
0.5 нМ, 20 ч	0	0
30 нМ, 2 ч	20.0 ± 4.4	2.2 ± 0.3
30 нМ, 4 ч	4.1 ± 0.4	0.9 ± 0.4
30 нМ, 20 ч	0	0

Примечание. Здесь и в табл. 1 и 2 соотношение эффекторов и мишеней 20 : 1. Для каждого случая даны средние значения цитотоксического индекса (ЦИ) из 12—18 измерений в 3 экспериментах.

ных и внеклеточных факторов. Благодаря высокой редокс-чувствительности ММП могут менять свою активность при действии оксидантов и антиоксидантов (Springman et al., 1990; Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990; Svingen et al., 2008). Мы показали, что введение NAC или ALA в среду культивирования клеток изменяет активность ММП — желатиназы ММП-2 и ММП-9 (Воронкина и др., 2008). Однако изменения, вызываемые присутствием NAC или ALA, были неравнозначными: NAC независимо от концентрации полностью инактивировал ММП-2 и ММП-9, а ALA лишь уменьшала активность ММП-2, хотя и значительно, и даже несколько увеличивала активность ММП-9 (Воронкина и др., 2008).

Чтобы понять, вносит ли вклад активность ММП-2 и ММП-9 в чувствительность клеток к литическому действию ЕКК, в настоящей работе мы исследовали этот параметр, инактивировав ММП у клеток 3Т3-SV40. Для этого использовали ингибитор ММП GM6001. Согласно инструкции фирмы-производителя, этот ингибитор подавляет практически все ММП, хотя действие его зависит от концентрации: в большой концентрации (30 нМ) ингибируется широкий спектр ММП, а в малой (до 5 мМ) — только некоторые, в частности ММП-2 и ММП-9 (Calbiochem, Германия). Из данных табл. 1 видно, что действие GM6001 на клетки 3Т3-SV40 зависит от концентрации и времени и может почти полностью лишить их чувствительности к действию ЕКК. При этом действие ингибитора фактически необратимо и продолжается после его удаления из среды независимо от его концентрации и времени присутствия в среде культивирования клеток. Как оказалось, многочасовое действие GM6001 вызывает в

конце концов гибель клеток, поэтому мы не будем его рассматривать. Итак, 4-часовое действие 0.5 нМ ингибитора GM6001 значительно уменьшает, но не подавляет чувствительность клеток к литической активности ЕКК. Заметим, что предобработка самих ЕКК ингибитором GM6001 в тех же концентрациях не влияла на их литическую активность. ЦИ клеток 3Т3-SV40 оставался неизменным — 25.7 ± 3.8 % против 27.1 ± 2.6 % в контроле. Поскольку действие GM6001 неспецифично в отношении конкретного типа ММП, мы использовали антитела против ММП-2 и ММП-9 для их инактивации, чтобы выявить, насколько необходима именно их активность для сохранения чувствительности клеток 3Т3-SV40 к литической активности ЕКК.

Результаты цитотоксического теста после 1-часового связывания ММП-2 и ММП-9 соответствующими антителами приведены в табл. 2. Оказалось, что ЦИ клеток 3Т3-SV40 уменьшается лишь в случае предобработки клеток антителами к ММП-2 и практически не изменяется в случае использования антитела к ММП-9. Степень уменьшения ЦИ после обработки клеток 3Т3-SV40 антителами к ММП-2 или ингибитором GM6001 приблизительно одинакова.

Таким образом, инактивирование желатиназы ММП-2 с помощью ингибитора, специфических антител или антиоксиданта ALA быстро приводит к потере трансформированных клетками чувствительности к действию ЕКК. По-видимому, принципиальная схема молекулярных событий при действии этих агентов одинакова и ММП-2 является ее обязательным и достаточным участником. Однако в эту схему не вписывается действие прямого антиоксиданта NAC, поскольку при его действии полного выключения ММП-2 недостаточно для изменения чувствительности клеток 3Т3-SV40 к литической активности ЕКК. Эта чувствительность изменяется лишь во времени после удаления NAC из среды клеток в результате каких-то вторичных изменений, следующих, в частности, за выключением ММП-2. Кроме того, сам механизм инактивирования ММП при действии NAC и других испытанных агентов может быть разным. Необходимо учитывать и то, что любой агент может иметь не одну мишень, а несколько. ALA, как и окисленный глутатион (Cho et al., 2003; Filomeni et al., 2003), может иметь свои специфические мишени и на поверхности клетки. Следствием антиоксидантного действия, выключения или уменьшения активности ММП в среде может быть и изменение активности ММП мембранного типа (MT-ММП), от которых тоже зависят многие функции клетки. Так, одна из мембранных ММП (MT1-ММП) прямо связана с активностью ММП-2 (Mott, Werb, 2004). К каким молекулярным перестройкам в клетке может приводить выключение или уменьшение активности ММП-2 — предмет дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность И. В. Воронкиной за участие в обсуждении работы и помощь в получении ряда реактивов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48586 и 09-04-00467), а также частичной поддержке программы президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-774.2008.4) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Т а б л и ц а 2

**Активность спленоцитов мышей СЗНА
в отношении клеток 3Т3-SV40,
обработанных антителами к ММП-2 и ММП-9**

Варианты предобработки	ЦИ, %
3Т3-SV40 (контроль)	28.8 ± 4.6
3Т3-SV40 + АТ к ММП-2	12.9 ± 3.9
3Т3-SV40 + АТ к ММП-9	28.6 ± 4.3
3Т3-SV40 + (АТ к ММП-2 + АТ к ММП-9)	13.9 ± 4.1

Список литературы

- Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2008. Изменение активности матричных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология. 50 (10) : 879—883.
- Мальгин А. М., Апреликова О. Н. 1982. Естественная противоопухолевая активность спленоцитов мышей СЗНА. Эксперим. онкология. 4 (3) : 37—39.
- Рыкова М. П., Спиранде И. В., Зедгендзе М. С., Ляхов В. В., Фукс Б. Б. 1981. Новая высокочувствительная техника тестирования нормальных киллеров. Иммунология. 1 : 88—90.
- 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—167.
- Almeida C. R., Davis D. M. 2006. Segregation of HLA-C from ICAM-1 at NK cell immune synapses is controlled by its cell surface density. J. Immunol. 177 : 6904—6910.
- Andoniou C. E., Andrews D. M., Degli-Esposti M. A. 2006. Natural killer cells in iral infection: more than just killers. Immunol. Rev. 214 : 239—250.
- Cho K. J., Moini H., Shon H. S., Chung A. S., Packer L. 2003. Alpha-lipoic acid decreases thiol reactivity of the insulin receptor and protein tyrosine phosphatase 1B in 3T3-L1 adipocytes. Biochem. Pharmacol. 66 : 849—858.
- Davis D. M., Chiu I., Fassett M., Cohen G. B., Mandelboim O., Strominger J. L. 1999. The human natural killer cell immune synapse. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 15 061—15 067.
- Duwe A. K., Werkmeister J., Roder J. C., Lauzon R., Payne U. 1985. Natural killer cell-mediated lysis involves a hydroxyl radical-dependent step. J. Immunol. 134 : 2627—2644.
- Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2003. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. FASEB J. 17 : 64—66.
- Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komissarchik 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.
- Hashimoto Y., Sudo H. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from ^3H -uridine labeled cells. Gann. 62 : 139—145.
- 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.
- Moini H., Packer L., Saris N. E. 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Toxicol. Appl. Pharmacol. 182 : 84—90.
- Moretta L., Bottino C., Pende D., Mingari M. C., Biassoni R., Moretta A. 2002. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. Eur. J. Immunol. 32 : 1205—1211.
- Moretta L., Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. EMBO J. 23 : 255—259.
- Mott J. D., Werb Z. 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. Cur. Opin. Cell Biol. 16 : 558—564.
- 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.
- Packer L., Witt E. H., Tritschler H. J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic. Biol. Med. 19 : 227—250.
- Sen C. K., Packer L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. Amer. J. Clin. Nutr. 72 (Suppl. 2) : 653S—669S.
- Springman E. B., Angleton E. L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H. E. 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a «cysteine switch» mechanism for activation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87 : 364—368.
- Suthanthiran M., Solomon S. D., Williams P. S., Rubin A. L., Novogrodsky A., Stenzel K. H. 1984. Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. Nature. 307 : 276—278.
- Svingen G., Ravuri C., Rikardsen O., Huseby N. E., Winberg J. O. 2008. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. Connect Tissue Res. 49 : 197—202.
- 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.
- Van Wart H. E., Birkedal-Hansen H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87 : 5578—5582.
- 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.
- Watzl B., Bub A., Briviba K., Reckemmer 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.
- Westermarck J., Kähäri V. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J. 13 : 781—792.

Поступила 24 XII 2008

EFFECT OF ALPHA-LIPOIC ACID ON THE SENSITIVITY OF TRANSFORMED FIBROBLASTS TO LYSIS BY NATURAL KILLER CELLS. COMPARISON WITH NAC ACTION

N. A. Filatova, K. M. Kirpichnikova, E. A. Vahromova, I. A. Gamaley¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

The purpose of this study was to compare the effects of two antioxidants, alpha-lipoic acid (ALA) and N-acetylcysteine (NAC) on the sensitivity of 3T3-SV40 fibroblasts to lytic activity of natural killer (NK) cells. ALA (1.25 mM) reduced significantly the fibroblast sensitivity in several hours, whereas NAC (10 mM) did not change it. Subsequent removal of the antioxidants from the cultivation medium resulted in gradual recovery of the sensitivity in the case of ALA and in complete loss of it in the case of NAC. Inactivation of gelatinase MMP-2 (matrix metalloproteinase) using pretreatment of the cells with the inhibitor of MMP, G6001, or speci-

fic antibodies to MMP-2 or MMP-9 resulted in decrease of 3T3-SV40 sensitivity to NK cells activity. This effect was similar to that of ALA, not to the NAC one. Pretreatment of NK cells with G6001 did not influence their lytic activity. The results obtained demonstrate that the direct antioxidant, NAC (having reduced thiol groups), and the indirect one, ALA (reducing thiol groups and acting as a direct antioxidant only inside the cell) activate principally different intracellular signal pathways. However, both NAC and ALA pathway includes inactivation of MMP-2.

Key words: alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine, 3T3-SV40 fibroblast, cytotoxic activity, natural killer cells, matrix metalloproteinases.
