

Н-АЦЕТИЛЦИСТЕИН УМЕНЬШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК К ЛИТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК

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

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

Исследовали способность N-ацетилцистеина (НАС) менять фенотипические свойства разных трансформированных и эмбриональных клеток. Показателем служила чувствительность клеток к литической активности естественных киллерных клеток (ЕКК). Обнаружили, что клетки эпидермоидной карциномы человека A431, клетки мышинной гепатомы МГ22а, обработанные 10 мМ НАС, так же как и исследованные нами ранее трансформированные мышинные фибробласты 3Т3-SV40, нормализуют свой фенотип, хотя и в разной степени. Нормализация выражается в том, что после действия НАС клетки становятся не узнаваемыми ЕКК и не уничтожаются ими, что делает их похожими на нетрансформированные клетки. Мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ) оказались чувствительными к действию ЕКК и уничтожались ими с той же активностью, что и трансформированные клетки. Так же как и трансформированные клетки, МЭФ резко уменьшали чувствительность к активности ЕКК после действия 10 мМ НАС. Потеря чувствительности клеток к действию киллеров сопровождается обязательной реорганизацией актинового цитоскелета и появлением в клетке хорошо выраженных стресс-фибрилл.

Ключевые слова: N-ацетилцистеин, клетки A431, МГ22а, 3Т3-SV40, эмбриональные фибробласты, естественные киллерные клетки, актиновый цитоскелет.

Трансформация клеток характеризуется многочисленными изменениями нормального фенотипа. Это потеря контактного торможения, ослабление адгезивных свойств и межклеточных контактов (Katsantonis et al., 1994; Gloushankova et al., 1997, 1998). Изменение фенотипа делает клетку уязвимой для некоторых факторов, к которым она была нечувствительна до трансформации (Long, Rajagopalan, 2002; Moretta, Moretta, 2004). Так, трансформированные, опухолевые или зараженные вирусом клетки распознаются и уничтожаются естественными киллерными клетками (ЕКК). Одним из функциональных нарушений вследствие трансформации клетки может быть не только приобретение чувствительности к действию ЕКК, но и увеличение чувствительности к инвазии некоторыми бактериями, например *Escherichia coli* (Efremova et al., 2001) или *Listeria monocytogenes* (Velge et al., 1994).

ЕКК традиционно рассматривают как клетки, осуществляющие иммунный надзор за состоянием клеточной пролиферации и цитодифференцировки (см. обзор: Moretta, Moretta, 2004; Caligiuri, 2008). Кроме того, ЕКК могут распознавать и лизировать некоторые эмбриональные клетки (Sumitran et al., 1999; Frenzier et al., 2009).

Нами показано, что трансформированные мышинные фибробласты 3Т3-SV40, которые в норме распознаются и лизируются ЕКК, меняют в сторону нормализации свой фенотип и теряют чувствительность к литическому действию ЕКК, если они обработаны антиоксидантом N-ацетилцистеином (НАС) или альфа-липоевой кислотой. Эта же обработка нетрансформированных клеток 3Т3 не

влияет на их устойчивость к действию ЕКК (Филатова и др., 2006, 2008а). Нормализация фенотипа выражалась не только в потере чувствительности клеток к действию ЕКК, но и в морфологических изменениях, включающих в себя, в частности, стабилизацию актинового цитоскелета (Gamaley et al., 2006).

Для того чтобы понять, насколько универсально действие НАС в отношении чувствительности трансформированных клеток к активности ЕКК, в настоящей работе мы испытывали другие трансформированные клетки (A431 и клетки гепатомы) на их чувствительность к литической активности после действия НАС. В число объектов мы включили еще эмбриональные клетки, которые могут распознаваться ЕКК (Sumitran et al., 1999; Frenzier et al., 2009). Параллельно исследовали влияние НАС на изменение структур актинового цитоскелета в эмбриональных клетках и клетках гепатомы.

Материал и методика

Клетками-мишенями служили трансформированные мышинные фибробласты линии 3Т3-SV40, клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431, клетки мышинной гепатомы линии МГ22а (все из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН), а также эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ), выделенные из 12-суточных эмбрионов и любезно предоставленные И. В. Кожухаровой (Институт цитологии РАН). Клетки МГ22а обладают опухолевыми свойствами в

отличие от других использованных трансформированных клеток. Трансформированные клетки культивировали согласно их паспорту. МЭФ культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия). Концентрированный раствор НАС (pH 7.0) (Sigma, США) готовили перед экспериментом и вводили в среду культивирования клеток до необходимой конечной концентрации на 20 ч. Затем среду заменяли на новую, не содержащую НАС, и культивировали еще 20 ч.

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 (Филатова и др., 2008б), 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) по модифицированной нами методике (Филатова и др., 2008б). Клетки-мишени метили ^3H -уридином, после чего клетки отмывали от остатков ^3H -уридина и НАС. Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в %. Величину ЦИ оценивали при разном соотношении клеток-эффекторов и клеток-мишеней (Э и М): 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1 и 50 : 1.

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

После всех опытов жизнеспособность клеток оценивали по способности окрашиваться трипановым синим. Обработку результатов проводили с помощью программы MS Excel 2007. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $P \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе использовали ту же экспериментальную модель, что и ранее. Клеточные показатели оценивали после 20-часового действия 10 мМ НАС и через 20 ч после его удаления из среды культивирования, когда происходит нормализация (частичная реверсия) трансформированного фенотипа. Ранее чувствительность клеток 3Т3-SV40 к активности ЕКК мы оценивали только при одном соотношении Э и М (20 : 1) (Филатова и др., 2006, 2008а; Gamaley et al., 2006). Поскольку доля киллерных клеток в популяции спленоцитов невелика (7–10 %) (Grimm, Bonavida, 1979; Mattes et al., 1979), а активность ЕКК по отношению к разным клеткам разная, в настоящей работе величину ЦИ для всех клеток, включая 3Т3-SV40, оценивали при разном соотношении Э и М: 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1 и 50 : 1. Жизнеспособность всех исследованных клеток в присутствии НАС не менялась. Ре-

зультаты изменения чувствительности клеток-мишеней, обработанных НАС, представлены на рис. 1.

Клетки-мишени 3Т3-SV40. Рис. 1, а показывается, что величина ЦИ тем больше, чем больше доля ЕКК при сокультивировании их с клетками-мишенями, как с контрольными, так и обработанными НАС (10 мМ). В присутствии НАС величина ЦИ достоверно превышает контрольное значение только при соотношении Э и М 10 : 1. Удаление НАС приводит к резкому уменьшению ЦИ при всех соотношениях Э и М. Наиболее значимую величину (10 %) ЦИ имеет только при самом большом соотношении Э и М — 50 : 1 (рис. 1, а).

Клетки-мишени А431. Величина их ЦИ, как и для клеток 3Т3-SV40, увеличивается с увеличением доли ЕКК в среде при совместном культивировании с клетками А431 (рис. 1, б). Но во всех случаях после удаления антиоксиданта наблюдается уменьшение чувствительности клеток (уменьшение величины ЦИ) к действию ЕКК. Наиболее выразительно падение величины ЦИ при минимальном соотношении Э и М (5 : 1). Обращает на себя внимание увеличение чувствительности к действию ЕКК клеток, обработанных НАС. Но это увеличение регистрируется только при высоких соотношениях Э и М. А при соотношении Э и М 5 : 1 или 10 : 1 величины ЦИ ниже контрольных значений приблизительно в 2 раза (рис. 1, б). После удаления антиоксиданта во всех случаях величина ЦИ падает ниже контрольного значения. Однако это падение не столь значительно, как для клеток 3Т3-SV40 (ср. с рис. 1, а).

Клетки-мишени МГ22а в тех же экспериментальных условиях ведут себя подобно клеткам, описанным выше: не теряют чувствительность к ЕКК в присутствии 10 мМ НАС, но резко уменьшают ее после удаления НАС из среды культивирования. При соотношении Э и М не более 20 : 1 чувствительность клеток МГ22а к литическому действию ЕКК близка к 0 (рис. 1, в). Присутствие 10 мМ НАС значительно увеличивает чувствительность этих клеток к ЕКК при всех соотношениях Э и М. ЦИ во всех случаях возрастает более чем в 2 раза (рис. 1, в). В связи с тем что эти клетки оказались более чувствительными к действию НАС, нежели другие, мы провели те же эксперименты с действием НАС в меньшей концентрации (2 и 5 мМ). Результаты показаны на рис. 2. Видно, что уменьшение концентрации НАС влияет на оба результата — на чувствительность клеток к активности ЕКК как в его присутствии, так и после его удаления. Все показатели уменьшаются с уменьшением концентрации НАС. Потеря чувствительности клеток МГ22а после удаления НАС наиболее значима только в случае концентрации НАС 10 мМ, хотя характер зависимостей в случае действия НАС 10 и 5 мМ практически одинаков (рис. 1, в; 2, а). В случае действия 2.5 мМ НАС различия между величинами ЦИ в контроле, во время и после действия НАС не достоверны. Заметим, что потеря чувствительности к активности ЕКК клетками 3Т3-SV40, обработанными НАС, приблизительно одинакова в пределах концентрации НАС 2–10 мМ (Филатова и др., 2008а).

Клетки-мишени МЭФ оказались интересны тем, что они, во-первых, чувствительны к действию ЕКК, а во-вторых, их чувствительность зависела от числа удвоений, пройденных клетками. В наших экспериментах пролиферация МЭФ замедлялась и останавливалась на 6-м пассаже, после чего культура погибала. По мере пролиферации и роста клетки постепенно теряли чувствитель-

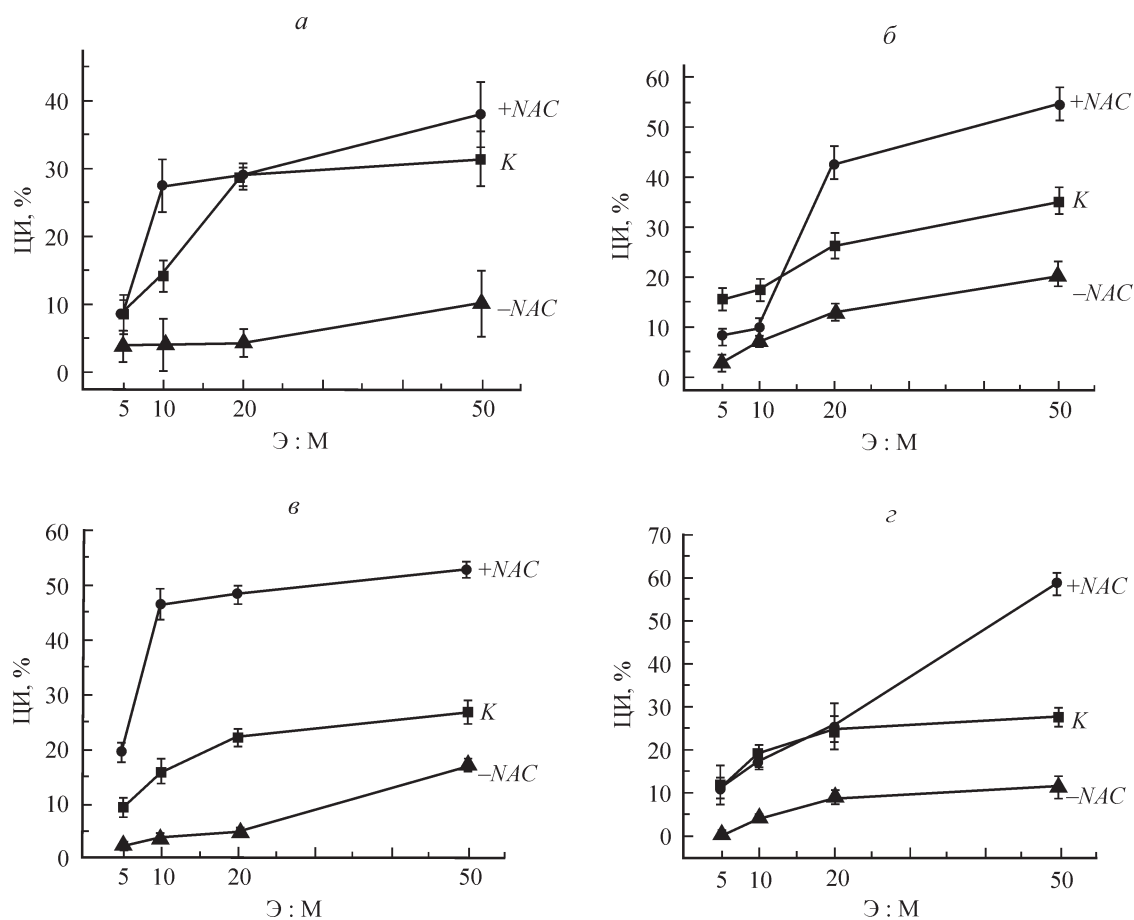


Рис. 1. Изменение чувствительности разных клеток, обработанных антиоксидантом NAC (10 мМ), к литической активности естественных киллерных клеток при разном соотношении клеток-эффекторов (Э) и клеток-мишеней (М).

Э : М — соотношение клеток-эффекторов (Э) и клеток-мишеней (М). Клетки-мишени: а — 3Т3-SV40, б — А431, в — МГ22а, г — эмбриональные фибробласты мыши. Величину цитотоксического индекса (ЦИ) оценивали для клеток в контроле (К), через 20 ч после введения в среду культивирования 10 мМ NAC (+NAC) и через 20 ч после его удаления (-NAC). Приведены средние и их стандартные ошибки ($n = 18$).

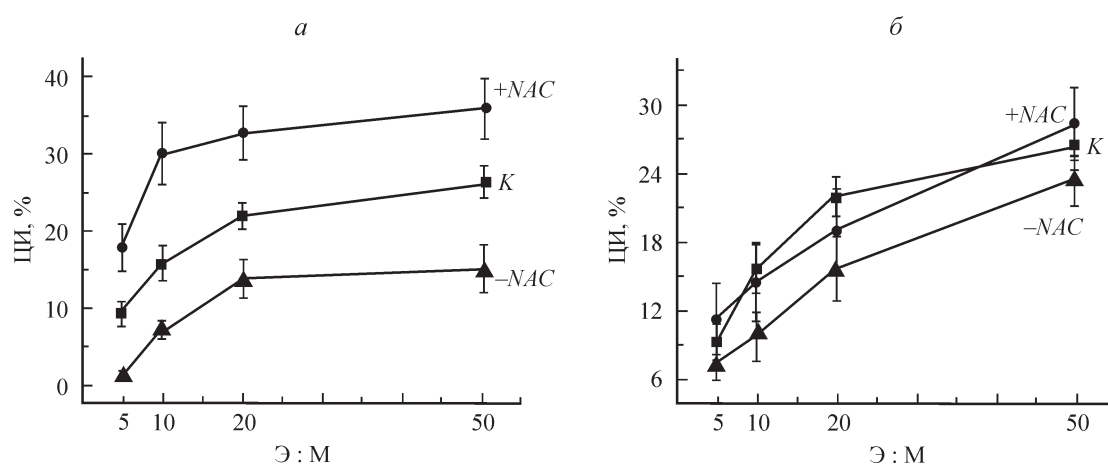


Рис. 2. Изменение чувствительности клеток гепатомы МГ22а, обработанных антиоксидантом NAC в концентрации 5 (а) или 2.5 (б) мМ, к литической активности естественных киллерных клеток.

Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n = 6$). Другие объяснения в подписи к рис. 1.

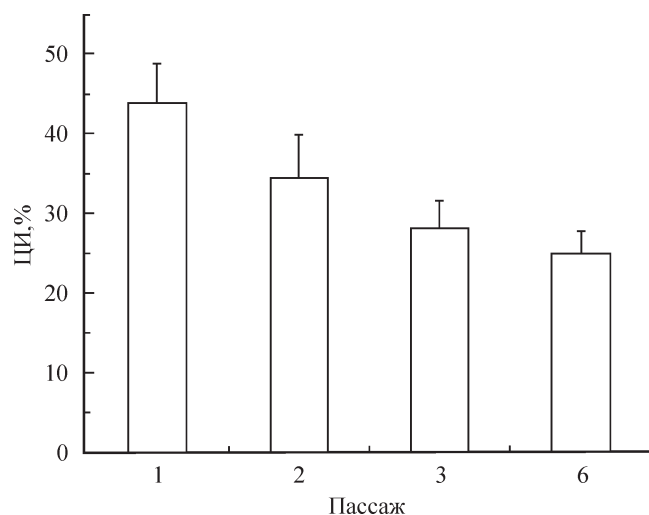


Рис. 3. Чувствительность мышинных эмбриональных фибробластов разных пассажей к литическому действию естественных киллерных клеток.

ЦИ — цитотоксический индекс. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n = 6$). Различие между значениями ЦИ в 1-м и 6-м пассажах достоверно ($P \leq 0.05$).

ность к действию ЕКК: величина ЦИ клеток 6-го пассажа при соотношении Э и М 1 : 20 была почти в 2 раза меньше, чем у клеток 1-го пассажа (24.7 ± 2.9 и 43.9 ± 4.9 соответственно; рис. 3), но находилась в пределах значений, сравнимых со значениями для трансформированных клеток. На рис. 1, з показано изменение чувствительности МЭФ 6-го пассажа, обработанных НАС, к литической активности ЕКК. НАС не изменял эту чувствительность МЭФ, если соотношение Э и М не было максимальным (50 : 1), при котором активность ЕКК резко возрастала. Так же как и трансформированные клетки, МЭФ изменяли свой фенотип и становились малочувствительными после обработки их НАС, т. е. после удаления антиоксиданта. При всех соотношениях Э и М величины ЦИ были значительно меньше контрольных значений (рис. 1, з).

Таким образом, мы показали, что не только трансформированные фибробласты 3T3-SV40, но и другие трансформированные клетки (гепатомы МГ22а, обладающие опухоленными свойствами, А431), а также эмбриональные фибробласты мышцы теряют чувствительность к киллерной активности, если их сначала обработать антиоксидантом НАС, а потом его удалить. Потеря чувствительности зависит от доли киллерных клеток в среде сокультивирования. В присутствии самого НАС чувствительность к действию ЕКК зависит от клеток и либо не изменяется, либо возрастает по отношению к контрольным величинам; результат зависит от соотношения Э и М (рис. 1).

Изменения актинового цитоскелета клеток МГ22А и МЭФ показаны на рис. 4 и 5. Эти клетки, как и клетки 3T3-SV40 (Ефремова и др., 2004), в присутствии НАС изменяют форму, их актиновый цитоскелет и имеющиеся стресс-фибриллы частично разбираются, появляются скопления аморфного актина. Реорганизация требует времени и происходит не ранее, чем через несколько часов после введения НАС в среду. Сама реорганизация еще не уменьшает чувствительности клеток к действию ЕКК (рис. 1, в, з). Удаление НАС из среды культивирова-

ния постепенно приводит к появлению в большей части клеток толстых пучков стресс-фибрилл, более выраженных, чем в контрольных клетках (рис. 4, в; 5, в, з). В МЭФ, прошедших обработку НАС, нередко организация актина в толстые пучки, расположенные под углом друг к другу, показанные на рис. 5, з. Однако такая организация стресс-фибрилл иногда встречается и в контрольных клетках. В клетках А431 тоже происходит реорганизация актинового цитоскелета в присутствии НАС и после его удаления, однако изменения не имеют столь выраженного и яркого характера, как в других клетках (не показано). Но все клетки уменьшали чувствительность к действию ЕКК только после удаления антиоксиданта из среды и сохраняли потерю не менее 48 ч.

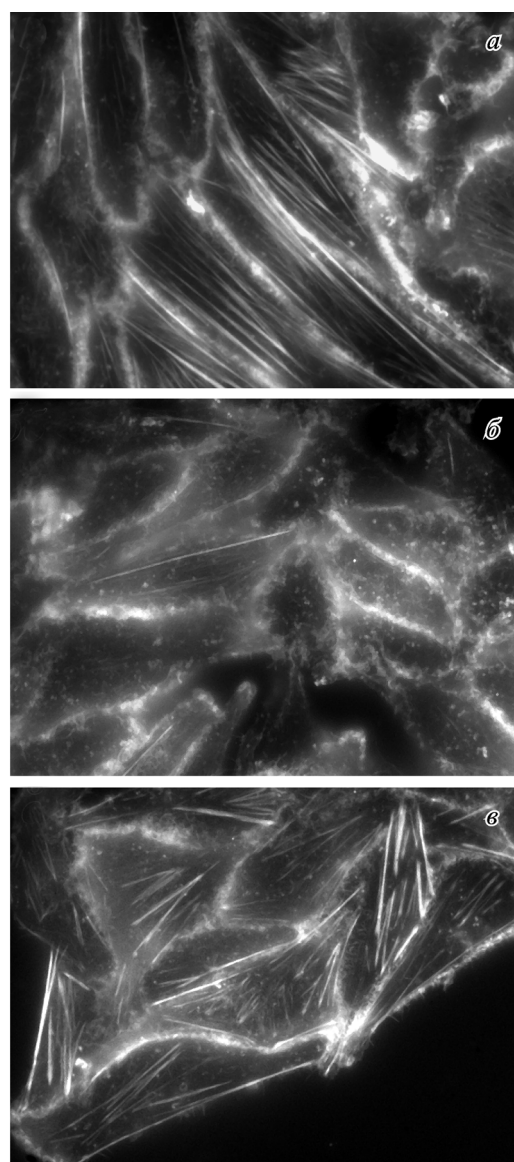


Рис. 4. Изменения актинового цитоскелета клеток мышинной гепатомы МГ22а после введения в среду культивирования (б) и последующего удаления из нее (в) НАС в концентрации 10 мМ.

а — контроль, б — через 20 ч действия НАС, в — через 20 ч после удаления НАС из среды. Здесь и на рис. 5 представлены флуоресцентные микрофотографии актина, окрашенного родамин-фаллоидином. Об.: Н1 100×.

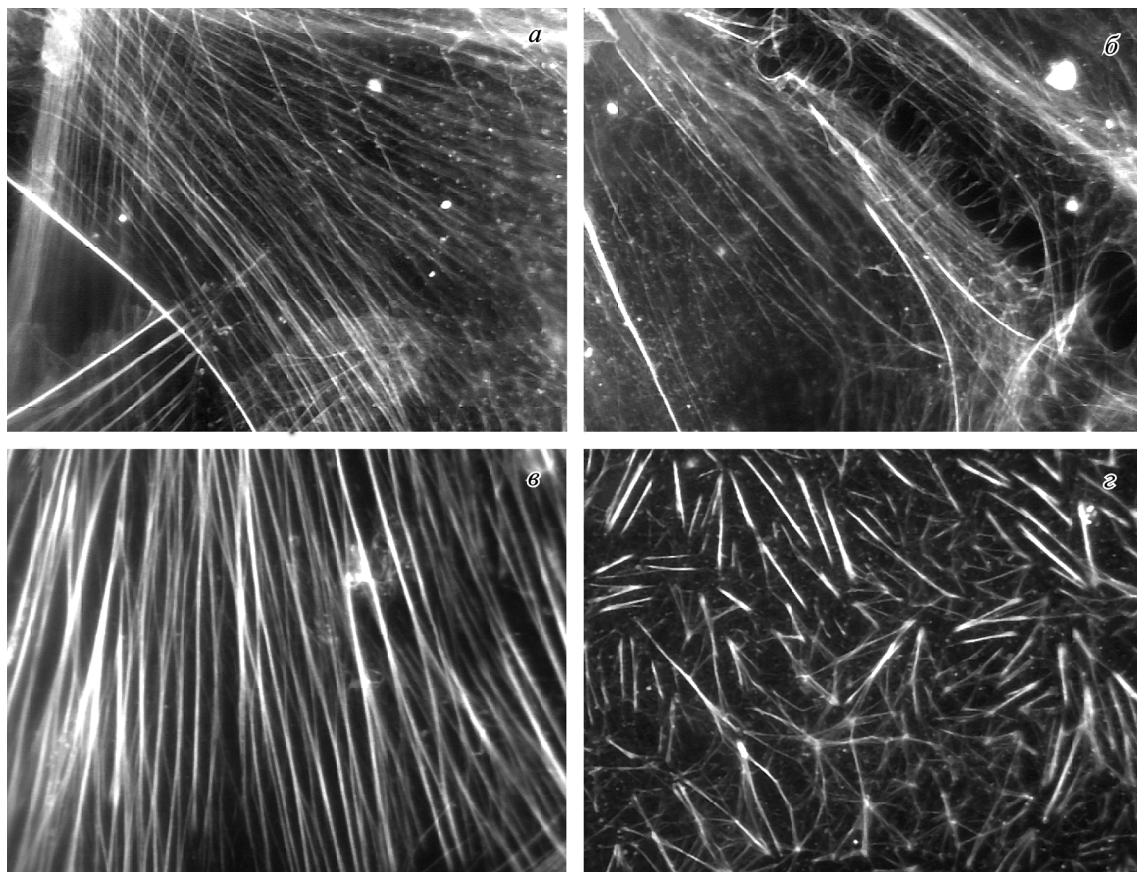


Рис. 5. Изменения актинового цитоскелета мышинных эмбриональных фибробластов после введения в среду культивирования (б) и последующего удаления из нее (в, г) НАС в концентрации 10 мМ.

а — контроль, б — через 20 ч действия НАС, в, г — через 20 ч после удаления НАС из среды.

Обсуждение

Итак, обнаруженная нами способность НАС изменять фенотип проявляется в отношении самых разных трансформированных клеток и эмбриональных, что заставляет предполагать общие механизмы, лежащие в основе уменьшения чувствительности клеток к действию ЕКК.

Данные литературы свидетельствуют о том, что внимание исследователей приковано главным образом к литической машине ЕКК. Причины изменения цитотоксичности ЕКК (как и Т-лимфоцитов, и макрофагов) при различных нарушениях исследователи, как правило, ищут в литическом механизме киллерной клетки (Topham, Hewitt, 2009). Основой узнавания клеток-мишеней является наличие специальных рецепторов (рецепторов естественной цитотоксичности) у ЕКК, с одной стороны, и лигандов к этим рецепторам (молекул главного комплекса гистосовместимости — МНС) на поверхности клеток-мишеней — с другой (Takeda, Okumura, 2004; Topham, Hewitt, 2009). Экзоцитоз секреторной лизосомы ЕКК в клетку-мишень — это сложный многоступенчатый, строго регулируемый и координированный процесс. Для секреции литического содержимого из лизосомы ЕКК (как и Т-лимфоцитов) в клетку-мишень требуются реорганизация тубулинового и актинового цитоскелета ЕКК, образование контакта и слияние с мембраной клетки-мишени — процессы, к которым привлекается множество белков цитотоксической клетки (Topham, Hewitt, 2009).

Естественно предположить, что сложнейшая машина цитотоксического лизиса должна требовать строгого соответствия в месте контакта между ЕКК и плазматической мембраной клетки-мишени. Оно должно выражаться не только в наличии молекул узнавания, но и в структуре окружения этих молекул на поверхности клетки-мишени, тем более что универсальных детерминант узнавания у клеток-мишеней пока не обнаружено. Что же касается молекул МНС, то корреляции между экспрессией этих антигенов и цитотоксичностью ЕКК может не быть (Smithson et al., 1992). Изменение поверхностных характеристик клеток при разных воздействиях может нарушать нормальное взаимодействие эффекторной клетки и клетки-мишени. Именно это мы и наблюдаем в экспериментах по действию НАС на разные клетки.

Потеря чувствительности клеток к активности ЕКК, как показано в настоящей работе, обязательно сопровождается реорганизацией актинового цитоскелета, которая выражается в появлении хорошо выраженных стресс-фибрил, способствующих большей распластанности клеток, более жесткой формы и, безусловно, морфологически иной поверхности. Показанное нами быстрое изменение активности матриксных металлопротеаз (ММП) при действии НАС (Воронкина и др., 2008) может быть причиной перестройки внеклеточного матрикса и последующих изменений поверхностных характеристик клеток и структуры ее цитоскелета. В действии антиоксиданта реорганизация актинового цитоскелета, как показывают

наши эксперименты, является вторичным событием (требующим времени), но необходимым для итоговых молекулярных изменений поверхности клетки и ее чувствительности к активности ЕКК. Связующим событием может быть изменение интегринзависимой адгезии и распластанности клеток (Svingen et al., 2008). В настоящее время белки внеклеточного матрикса (более всего ММП, чувствительные к SH-содержащим агентам) и их активность привлекают пристальное внимание исследователей в связи с поведением клеток, главным образом опухолевых и трансформированных (Зубова, Окулов, 2001; Sternlicht, Werb, 2001; Goldman et al., 2003; Weiss et al., 2003; Pei et al., 2006).

Интересными кажутся данные о чувствительности (и ее изменении) нормальных клеток (МЭФ) к литической активности ЕКК. Потеря МЭФ этой чувствительности в результате действия антиоксиданта может быть интересна трансплантологам, стремящимся к уменьшению этой характеристики после пересадки тканей и клеток. МЭФ традиционно используют, во-первых, для получения постоянных клеточных линий с помощью спонтанной или индуцированной иммортализации, а во-вторых, в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых клеток (Todaro, Green, 1963; Camarasa et al., 2009). Продолжительность жизни первичных эмбриональных фибробластов видоспецифична, у мышиных число клеточных удвоений невелико — 18–20 (Hayflick, 1979), поэтому культивирование МЭФ непродолжительно (в наших экспериментах около 3 нед). По мере пролиферации и роста свойства МЭФ постепенно меняются, пролиферация останавливается, и далее может произойти спонтанная иммортализация с резким изменением фенотипа клеток (Todaro, Green, 1963; Camarasa et al., 2009). Уменьшение чувствительности к киллерной активности МЭФ по мере пролиферации, возможно, отражает те изменения, которые эти клетки претерпевают на пути к остановке или спонтанной иммортализации. Например, активная продукция интерферона первичными МЭФ в ответ на внедрение вируса блокируется в результате изменения сигнального пути, регулирующего его образование, когда МЭФ становятся иммортализованными (Wang et al., 2009). Иммортализованные мышиные фибробласты 3Т3, как мы показали, обладают устойчивостью к литическому действию ЕКК и не теряют ее после действия NAC (Филатова и др., 2006).

Известно, что утрата молекул узнавания для ЕКК на поверхности эмбриональной клетки происходит в процессе дифференцировки. Такими молекулами может быть лиганд для рецептора NKG2D у ЕКК и молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 (Frenszies et al., 2009). Возможно, что аналогичной утрате способствует и NAC. Заметим, что уровень экспрессии молекул МНС у эмбриональных клеток очень низкий (Drukker et al., 2002). Есть данные о том, что NAC может усиливать адгезию ЕКК (Rivabene et al., 1995). Кроме того, в некоторых случаях прослеживается корреляция между литической активностью ЕКК и экспрессией на поверхности клетки-мишени адгезионной молекулы ICAM-1 (Smithson et al., 1992; Beal et al., 2008).

В пользу решающего участия структуры внеклеточного матрикса для взаимодействия ЕКК и мишеней служат данные об изменении чувствительности клеток к разным факторам при изменении адгезии клеток (Bharadwaj et al., 2004; Valentijn et al., 2004). Предполагается, что ключевыми сигнальными молекулами в этом случае могут быть актинсвязывающие белки, от которых зависят

дезорганизация (стабилизация) актинового цитоскелета (Bharadwaj et al., 2004) и модуляция клеточной поверхности.

Неполная ясность механизмов распознавания одних клеток другими относится не только к ЕКК, но и к другим распознающим клеткам — Т-лимфоцитам, макрофагам, бактериям. Трансформированные фибробласты 3Т3-SV40, прошедшие обработку NAC, теряют чувствительность не только к активности ЕКК, но и к бактериальной инвазии, что показано нами ранее (Gamaley et al., 2006). Механизмы взаимодействия бактерий и клеток совсем иные, нежели механизмы взаимодействия ЕКК и клеток-мишеней. Однако то, что клетки в одних и тех же условиях теряют чувствительность к столь разным объектам, как бактерии и ЕКК, позволяет предполагать некую общность в механизмах распознавания (и потери распознавания) одних клеток другими. Мы надеемся, что наши исследования помогут внести некоторую ясность в эти вопросы.

Авторы глубоко признательны И. И. Фридлянской за консультацию при обсуждении полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00467), гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2008. Изменение активности матриксных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мыши при действии антиоксидантов. Цитология. 50 (10) : 879—883.
- Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3Т3 и 3Т4-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5) : 395—403.
- Зубова С. Г., Окулов В. Б. 2001. Роль молекул адгезии в процессе распознавания чужеродных и трансформированных клеток макрофагами млекопитающих. Успехи соврем. биол. 121 (1) : 56—59.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2006. Уменьшение активности естественных киллеров по отношению к трансформированным фибробластам 3Т3-SV40, обработанным N-ацетилцистеином. Цитология. 48 (5) : 438—442.
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2008а. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 и их чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток. Цитология. 50 (3) : 261—268.
- Филатова Н. А., Тюряева И. И., Иванов В. А. 2008б. Распознавание и лизис естественными киллерами опухолевых клеток при участии ламинина. Цитология 50 (1) : 72—79.
- Beal A. M., Anikeeva N., Varma R., Cameron T. O., Norris P. J., Dustin M. L., Sykulev Y. 2008. Protein kinase C theta regulates stability of the peripheral adhesion ring junction and contributes to the sensitivity of target cell lysis by CTL. J. Immunol. 181 : 4815—4824.
- Bharadwaj S., Hitchcock-DeGregori S., Thorburn A., Prasad G. L. 2004. N terminus is essential for tropomyosin functions: N-terminal modification disrupts stress fiber organization and abolishes anti-oncogenic effects of tropomyosin-1. J. Biol. Chem. 279 : 14 039—14 048.
- Caligiuri M. A. 2008. Human natural killer cells. Blood. 112 : 461—469.

- Camarasa M., Brison D., Kimber S. J., Handyside A. H. 2009. Naturally immortalised mouse embryonic fibroblast lines support human embryonic stem cell growth. *Cloning Stem Cells*. 11 : 453—462.
- Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Eldor J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 9864—9869.
- Efremova T., Ender N., Brudnaja M., Komissarchik Y., Khaitlina S. 2001. Specific invasion of transformed cells by *Escherichia coli* A2 strain. *Cell Biol. Int.* 25 : 557—561.
- Frenzes L. P., Abdullah Z., Kriegeskorte A. K., Dieterich R., Lange N., Busch D. H., Krönke M., Utermöhlen O., Hescheler J., Sarić T. 2009. Role of natural-killer group 2 member D ligands and intercellular adhesion molecule 1 in natural killer cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells*. 27 : 307—316.
- Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komissarchik Y., Polozov Yu., Khaitlina 2006. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. *Cell Biol. Int.* 30 : 319—325.
- Gloushankova N. A., Krendel M. F., Alieva N. O., Bonder E. M., Feder H. H., Vasiliev J. M., Gelfand I. M. 1998. Dynamics of contacts between lamellae of fibroblasts: essential role of the actin cytoskeleton. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95 : 4362—4367.
- Gloushankova N., Ossoskaya V., Vasiliev J., Chumakov P., Kopnin B. 1997. Changes in p53 expression can modify cell shape of ras-transformed fibroblasts and epitheliocytes. *Oncogene*. 15 : 2985—2989.
- Goldman S., Weiss A., Eyali V., Shalev E. 2003. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol. Hum. Reprod.* 9 : 367—373.
- Grimm E., Bonavida B. 1979. Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. *J. Immunol.* 123 : 2861—2869.
- 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.
- Hayflick L. 1979. The cell biology of aging. *J. Invest. Dermatol.* 73 : 8—14.
- Katsantonis J., Tosca A., Koukouritaki S. B., Theodoropoulos P. A., Gravanis A., Stournaras C. 1994. Differences in the G/tot-actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes. *Cell Biochem. Funct.* 12 : 267—274.
- Long E. O., Rajagopalan S. 2002. Stress signals activate natural killer cells. *J. Exp. Med.* 196 : 1399—1402.
- Mattes M. J., Sharrow S. O., Herberman R. B., Holders H. T. 1979. Identification and separation of thy-1 positive mouse spleen cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 123 : 2851—2860.
- Moretta L., Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 23 : 255—259.
- Pei P., Horan M. P., Hille R., Hemann C. F., Schwendeman S. P., Mallery S. R. 2006. Reduced nonprotein thiols inhibit activation and function of MMP-9: implications for chemoprevention. *Free Rad. Biol. Med.* 41 : 1315—1324.
- 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.
- Smithson G., Wolcott R. M., Chervenak R. 1992. Tight conjugate formation is not always required for natural killer cell-mediated lysis. *Cell Immunol.* 145 : 30—42.
- Sternlicht M. D., Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 17 : 463—516.
- Sumitran S., Anderson P., Widner H., Holgersson J. 1999. Porcine embryonic brain cell cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Cell Transplant.* 8 : 601—610.
- 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.
- Takeda K., Okumura K. 2004. CAM and NK cells. *eCAM*. 1 : 17—27.
- Todaro G. J., Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17 : 299—313.
- Topham N. J., Hewitt E. W. 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 128 : 7—15.
- Valentijn A. J., Zouq N., Gailmore A. P. 2004. Anoikis. *Biochem. Soc. Trans.* 32 : 421—425.
- Velge P., Bottreau E., Kaeffer B., Pardon P. 1994. Cell immortalization enhances *Listeria monocytogenes* invasion. *Med. Microbiol. Immunol.* 183 : 145—158.
- Weiss A., Goldman S., Ben Shlomo I., Eyali V., Leibovitz S., Shalev E. 2003. Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 inhibition by N-acetylcysteine in the human term decidua and fetal membranes. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 189 : 1758—1763.
- Wang F., Barrett J. W., Ma Y., Dekaban G. A., McFadden G. 2009. Induction of alpha/beta interferon by myxoma virus is selectively abrogated when primary mouse embryo fibroblasts become immortalized. *J. Virol.* 83 : 5928—5932.

Поступила 15 XII 2009

N-ACETYL-CYSTEINE-INDUCED REDUCTION IN SUSCEPTIBILITY OF TRANSFORMED AND EMBRYONIC CELLS TO LYTIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS

I. A. Gamaley,¹ K. M. Kirpichnikova, E. A. Vakhromova, N. A. Filatova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

We studied N-acetylcysteine (NAC) ability to change the phenotype properties of several transformed and embryonic cells. We examined human epidermoid carcinoma A431 cells, murine hepatoma MH22a cells, and murine embryonic fibroblasts (MEFs) in terms of the sensitivity to natural killer (NK) recognition and abolishment. We have demonstrated that treatment with NAC (10 mM) results in a loss of susceptibility to NK cell activity by transformed A431 and MH22a cells similar to 3T3-SV40 transformed cells whose partial reversion caused by NAC was revealed by us before. We have shown that MEFs are also sensitive to NK activity and abolished by NK cells as well as transformed cells. MEFs pretreated with 10 mM NAC as well as transformed cells lose their susceptibility to NK cell activity. The loss of cell sensitivity to NK cytolytic activity was accompanied by a reorganization of the actin cytoskeleton and the appearance of well-pronounced stress-fibers.

Key words: N-acetylcysteine, A431 cells, MH22a cells, 3T3-SV40 fibroblasts, murine embryonic fibroblasts, natural killer cells.