

## АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА

© И. В. Воронкина, Е. А. Вахромова, К. М. Кирпичникова, Л. В. Смагина, И. А. Гамалей<sup>1</sup>

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru*

Показано, что введение в среду с клетками антиоксиданта N-ацетилцистеина (НАС, 2—10 мМ) быстро (2 ч) и полностью инактивирует активность матриксных металлопротеиназ (желатиназ MMP-2 и MMP-9 и коллагеназ MMP-1 и MMP-8), секретируемых мышинными трансформированными фибробластами 3T3-SV40. То же самое происходит и в бесклеточной среде (стандартной кондиционированной фибробластами среде HT-1080), что позволяет предполагать прямое (химическое) взаимодействие антиоксиданта с MMP, в результате которого ферменты теряют свою активность. Кроме того, в присутствии НАС уменьшается секреция клетками MMP-1 и MMP-9 (их количество в среде), однако не изменяется количество их тканевого ингибитора TIMP-1. Это свидетельствует о нарушении баланса между MMP-1, MMP-9 и TIMP-1. Изменения соотношения между MMP-2 и ее ингибитором TIMP-2 в среде клеток не происходит. Показано, что параллельно с этими изменениями происходят реструктуризация и перераспределение коллагена I на поверхности клетки. На основе полученных данных делается вывод о том, что антиоксидант может изменять структуру внеклеточного матрикса, а вместе с ним поведение и функционирование клетки.

Ключевые слова: N-ацетилцистеин, матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы MMP, внеклеточный матрикс, коллаген I.

Семейство матриксных металлопротеиназ (MMP) — это цинксодержащие протеолитические ферменты, вызывающие деградацию почти всех компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в соединительных тканях — коллагена, фибронектина, ламинина и др. (Curry, Osteen, 2003; Lai et al., 2006; Pei et al., 2006; Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990). Благодаря способности разрушать ВКМ эти протеиназы способствуют миграции злокачественных клеток, а также участвуют в процессах неоангиогенеза (см. обзор: Björklund, Koivunen, 2005). MMP секретируются клеткой в латентной форме и превращаются в активные протеиназы за счет разрыва связи между остатком цистеина в пропептидном домене и цинка в активном центре. Эта связь, получившая название цистеинового выключателя, чувствительна к действию самых различных факторов (Springman et al., 1990; Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990; Svineng et al., 2008).

In vivo активаторами MMP могут быть ростовые факторы и цитокины, но основным физиологическим активатором считается плазмин, образующийся в результате многостадийного процесса из плазминогена под действием его активаторов (Monea et al., 2002; Vayalil et al., 2005). In vitro MMP могут активироваться различными факторами небиологической природы: форболовыми эфирами, поверхностно-активными веществами, дисульфидными соединениями и разными окислителями (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990; Björklund, Koivunen, 2005; Pei et al., 2006). Однако данные, полученные in vitro, имеют немало противоречий, заключающихся в том, что ве-

щества с разными свойствами (например, содержащие и не содержащие SH-группу) могут оказывать одинаковое действие на MMP. Так, и восстановленный глутатион (Pei et al., 2006), и дисульфид альфа-липовая кислота (Lee et al., 2010; Cavdar et al., 2013) могут ингибировать желатиназы MMP-2 и MMP-9.

Ранее нами было показано, что антиоксидант N-ацетилцистеин (НАС) изменяет чувствительность трансформированных клеток 3T3-SV40 к литическому действию естественных киллерных клеток (Филатова и др., 2009; Гамалей и др., 2010) и бактериальной инвазии (Gamaley et al., 2006), и это уменьшение сопровождается падением активности MMP-2 и MMP-9 (Воронкина и др., 2008). Мы предположили, что функциональные изменения клеток могут быть результатом структурных изменений ВКМ за счет измененной активности MMP при действии антиоксиданта НАС.

Изменение активности MMP при действии антиоксиданта на клетку может быть обусловлено различными факторами. Ими могут быть внутриклеточные сигнальные молекулы, от активации (инактивации) которых зависят изменение синтеза MMP, их секреция клетками в среду и активность секретируемых MMP. Кроме того, антиоксидант, вводимый в ростовую среду клетки, может прямо влиять на активность секретируемых MMP. Сами MMP являются объектами ингибирования специфически тканевыми ингибиторами (TIMP), в комплексе с которыми (с нековалентной связью) они секретируются многими клетками. Описано четыре TIMP, ингибирующие

разные MMP, но наиболее полно изучены TIMP-1 и TIMP-2. TIMP-1 специфически связывает MMP-9 и MMP-1, а TIMP-2 — преимущественно MMP-2 (Baker et al., 2002; Dzwonek et al., 2004; Candelario-Jalil et al., 2009). Считается, что от соотношения между уровнем свободной MMP и ее ингибитором зависит структура ВКМ (Mautino et al., 1999; Henry et al., 2002).

В настоящей работе мы выясняли, какие причины (прямые или косвенные) лежат в основе изменений активности MMP при действии на клетку антиоксиданта NAC. Оценивали активность желатиназ MMP-2 и MMP-9 и коллагеназ MMP-1 и MMP-8, секретируемых трансформированными фибробластами, в присутствии NAC и зависимость этих изменений от активности тканевых ингибиторов MMP (TIMP-1 и TIMP-2). Параллельно исследовали прямое действие NAC на активность MMP и их связь с TIMP в бесклеточной среде, используя стандартную кондиционированную фибробластами среду. Кроме того, оценивали организацию и распределение коллагена I на поверхности клетки в результате влияния NAC как показатель структурных изменений ВКМ.

### Материал и методика

**Клетки.** Объектом исследования служили эмбриональные мышечные фибробласты 3Т3, трансформированные вирусом SV40 (клетки 3Т3-SV40). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (Биолот, Россия) до образования монослоя. Маточный раствор NAC (Sigma, США) свежего приготовления добавляли в среду культивирования клеток до необходимой концентрации на 1—24 ч. Перед добавлением в среду с клетками значение pH маточного раствора доводили до 7.0. NAC использовали в концентрациях от 0.2 до 10 мМ.

В модельных экспериментах использовали среду, кондиционированную фибробластами HT-1080 (КС). Известно, что эта среда содержит разные факторы, секретируемые клетками, в том числе MMP-1, MMP-2, MMP-8 и MMP-9, и рекомендуется как стандартная (Oliver et al., 1999). Используя один и тот же сбор КС, мы избегаемся от ошибок, связанных с индивидуальными различиями клеток разных посевов.

Протеолитическую активность MMP определяли методом зимографии (Oliver et al., 1999). В качестве субстрата использовали казеин (для определения активности коллагеназ MMP-1 и MMP-8) и желатин (для определения активности желатиназ MMP-2 и MMP-9). Пробы кондиционированной среды отделяли от клеток центрифугированием и смешивали с SDS-содержащим буфером без нагревания, после чего проводили электрофорез (Laemmli, 1970). Гель (10 % акриламида) содержал 1 мг/мл желатина или 0.5 мг/мл казеина. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. Количество белка в пробе определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976). После проведения электрофореза гель промывали 2.5%-ным раствором Тритона X-100 2 раза по 30 мин, после чего инкубировали в течение 12 ч в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 М NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0.05 % Brij 35. После инкубирования гель окрашивали Кумасси синим R-250; при этом зоны, содержащие MMP, проявлялись в виде неокрашенных полос. Идентификацию зон, соответствующих

MMP-2 и MMP-9, осуществляли по описанному методу (Oliver et al., 1999). Заметим, что зимография выявляет не только активную, но и латентную форму MMP. Она активируется во время электрофореза за счет денатурирующего действия SDS и выявляется на электрофореграмме в виде полосы, соответствующей меньшей молекулярной массе, чем у активной формы той же MMP (Toth et al., 2012). Мы анализировали суммарную активность для каждой MMP. Для количественного анализа гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan 2.1. Результаты денситометрии представляли в виде гистограмм.

Вестерн-блот-анализ проводили по обычной методике. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C extra, Amersham), неспецифическое связывание блокировали инкубацией в 5%-ном растворе обезжиренного молока на Tris-буфере. После этого мембрану инкубировали в течение ночи в растворе первых антител (разведение согласно рекомендациям фирмы-производителя) при 4 °С. Далее мембрану инкубировали в растворе вторых антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, и обрабатывали раствором для выявления активности щелочной фосфатазы BCIP/NBT. После проявления окраски мембрану промывали водой и сканировали. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы QuantiScan 2.1. Результаты денситометрии представляли в виде гистограмм. Так же как в случае зимографии, мы анализировали суммарное количество латентных и активных форм для всех MMP. В качестве первых антител использовали моноклональные антитела к MMP-1 (M6427, Sigma, США) и моноклональные антитела к MMP-2 и MMP-9 (соответственно MAB13407 и MAB 13456, Millipore, США), в качестве вторых антител — антитела против IgG мыши, конъюгированные со щелочной фосфатазой (A3562, Sigma, США). Вестерн-блот-анализа для MMP-8 не проводили. Для определения TIMP-1 и TIMP-2 использовали поликлональные антитела T8187 и T8062 (Sigma, США) соответственно и вторые антитела против IgG кролика, конъюгированные со щелочной фосфатазой (A3687, Sigma, США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на коллаген I типа. Клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и фиксировали 3.7%-ным раствором параформальдегида (на PBS) в течение 15 мин. Затем клетки промывали PBS 3 раза по 5 мин. Неспецифическое окрашивание блокировали, инкубируя клетки в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (на PBS) в течение 30 мин при комнатной температуре. Использовали поликлональные антитела против коллагена I типа человека (AB745 кроличьи, Millipore, США; разведение 1 : 20—1 : 40) или моноклональные антитела к коллагенам I, II и III (мышечные, MAB 1334, Millipore, США; разведение 1 : 50). Инкубацию с первыми антителами проводили при 4 °С в течение 16—18 ч. В качестве вторых антител использовали FITC-меченные антитела против кроличьего иммуноглобулина (разведение 1 : 300—1 : 500), с которыми клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин. Избыток антител удаляли, отмывая клетки 0.1%-ным раствором Tween 20 (на PBS) 3 раза по 5 мин. Покровные стекла с клетками монтировали на предметные в заключающую среду Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Inc., США). Для визуализации препаратов использовали конфокальный сканирующий микроскоп Lei-

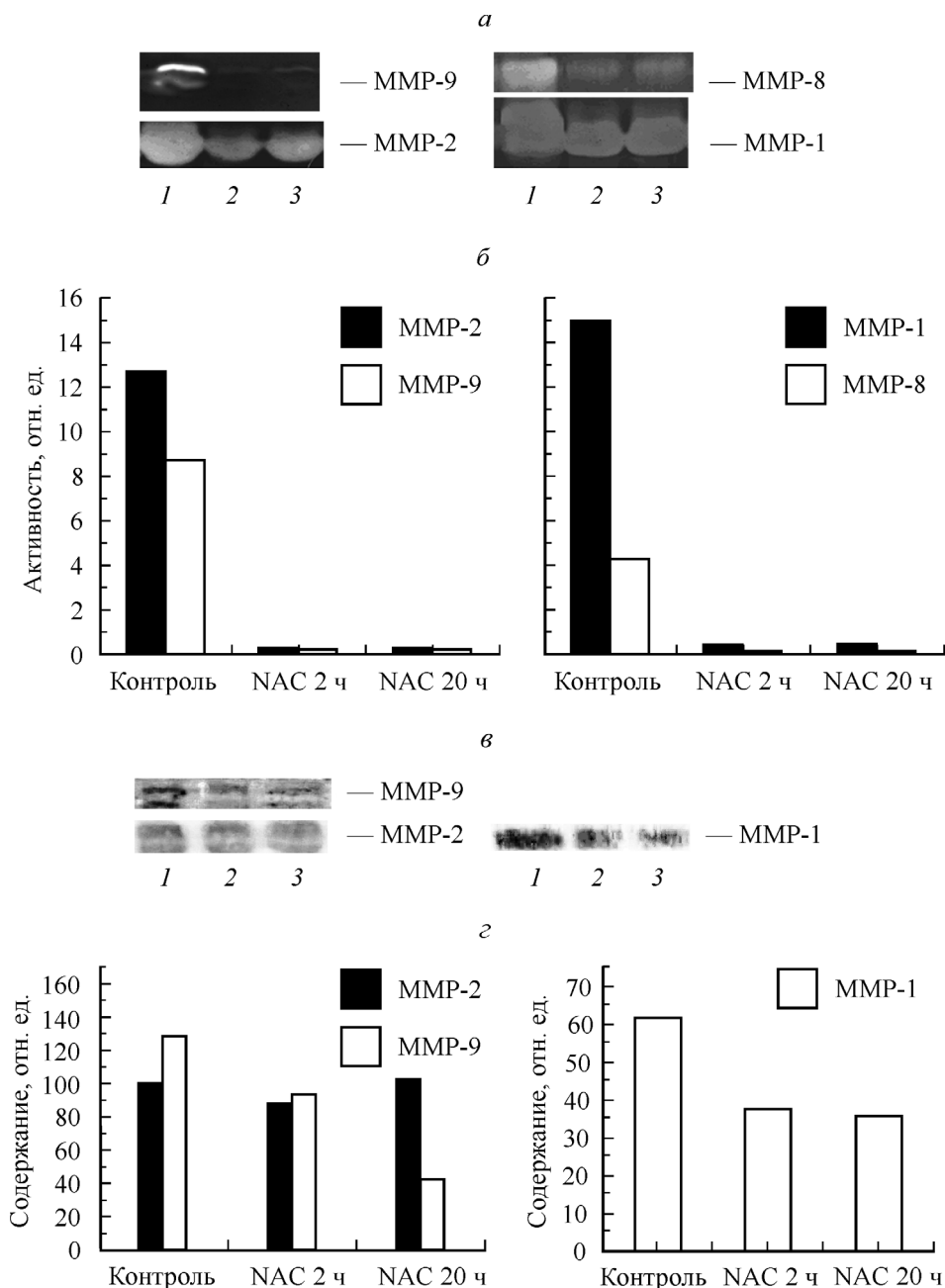


Рис. 1. Активность (а, б) и содержание (в, г) MMP в ростовой среде с фибробластами 3Т3-SV40 после введения 5 мМ NAC.

а — зимография на желатине (MMP-2; MMP-9) и казеине (MMP-1; MMP-8); б — результаты денситометрии соответствующих зимограмм; в, г — Вестерн-блоттинг и соответственно денситометрия полос на иммуноблоте. Дорожки: 1 — среда контрольных клеток, 2 и 3 — среда после введения NAC соответственно через 1 и 20 ч. Здесь и на рис. 3 две полосы для MMP-2 и MMP-9 соответствуют латентной и активной формам; на соответствующих гистограммах они суммированы. NAC подавляет активность всех MMP и уменьшает содержание MMP-1 и MMP-9.

са TCS SL (Германия). Использовали объектив HCX PLAPO CS 63×/1.32.

Все эксперименты проводили в трех повторностях.

### Результаты

Влияние NAC на активность и содержание MMP в клеточной среде. Изменение активности MMP в ростовой среде клеток оценивали с помощью зимографии на соответствующем субстрате, а содержание — с помощью Вестерн-блот-анализа. Введение NAC в среду клеток 3Т3-SV40 приводит к быстрому падению

активности желатиназ (MMP-2 и MMP-9) и коллагеназ (MMP-1 и MMP-8). Зимограммы на желатине и казеине, а также соответствующие им денситограммы показаны на рис. 1, а, б. Видно, что уже через 2 ч NAC в концентрации 5 мМ надолго (до 24 ч) и полностью подавляет активность всех MMP. Активность MMP-2 и MMP-9 падает ниже уровня, регистрируемого в контрольной среде. Подавление активности всех MMP наблюдается в концентрационном диапазоне NAC 2—10 мМ (не показано). Количественный анализ изменения MMP, секретируемых клетками в среду (Вестерн-блот-анализ), показывает (рис. 1, в, г), что NAC вызывает значительное уменьшение количества MMP-9, особенно при длительном дейст-

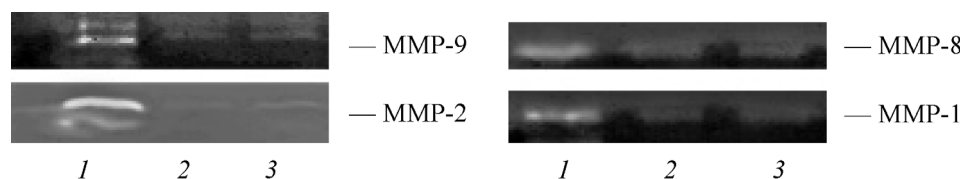


Рис. 2. Активность MMP в бесклеточной среде через 1 (дорожки 2) и 3 (дорожки 3) ч после введения 5 мМ NAC. NAC вводили в среду, кондиционированную фибробластами HT0-1080. Зимография на желатине (MMP-2; MMP-9) и казеине (MMP-1; MMP-8). 1 — среда контрольных клеток.

вии (24 ч), и уменьшение количества MMP-1. Некоторое уменьшение количества MMP-2, видимое на рисунке, по совокупности данных статистически незначимо (аналогичных данных для MMP-8 не получали).

Таким образом, введение в среду с клетками NAC полностью инактивирует активность желатиназ и коллагеназ, при этом уменьшается секреция клетками желатиназы MMP-9 и коллагеназы MMP-1.

Действие NAC в бесклеточной среде. Чтобы понять, является изменение активности протеаз в культуральной среде результатом прямого взаимодействия с антиоксидантом или оно обусловлено какими-то внутриклеточными процессами, вызванными действием антиоксиданта на клетку, мы провели модельные эксперименты, используя только стандартную КС клеток HT-1080. Оказалось, что введение NAC (5—10 мМ) в КС в отсутствие клеток тоже полностью подавляет активность всех MMP уже через 1 ч после введения (рис. 2). Результаты аналогичны при уменьшении времени действия до 30 мин (не показано). Таким образом, NAC действует на MMP в отсутствие клеток так же, как и в их присутствии, — ингибирует быстро и полностью. Вестерн-блот-анализ не показал изменений количества белков в этом случае (не демонстрируется).

Влияние NAC на ингибиторы TIMP и их комплексы с MMP. Активность MMP при действии NAC на клетки может изменяться не только в результате прямого действия антиоксиданта на фермент. Причиной

может быть и изменение баланса между свободными MMP (их количеством и активностью) и их тканевыми ингибиторами TIMP (TIMP-1 и TIMP-2) при действии NAC. Специфически TIMP-1 ингибирует MMP-9 и MMP-1, а TIMP-2 — преимущественно MMP-2. Поэтому следующий экспериментальный шаг заключался в исследовании участия TIMP-1 и TIMP-2 в изменении активности MMP-1, MMP-2 и MMP-9. Известно, что MMP-2 и MMP-9 образуют комплексы со своими ингибиторами, в которых MMP неактивны (Kolkenbrock et al., 1991, 1994), хотя надо заметить, что не все клетки (например, нейтрофилы) синтезируют MMP в комплексе со своим ингибитором (Ardi et al., 2007).

Вестерн-блот-анализ показывает, что за 2—24 ч действия в среде с клетками NAC увеличивает количество и свободного TIMP-2, и его комплекса TIMP-2/MMP-2 (рис. 3, а, б). Незначительное увеличение количества TIMP-1 и его комплекса, видимое на рисунке, из-за разброса данных статистически незначимо. Комплекс TIMP с MMP-1 нами не выявлен, данных в литературе по этому поводу тоже нет. Мы проверили действие NAC на тканевые ингибиторы и их комплексы в бесклеточной среде. В этих экспериментах можно было ожидать лишь изменения соотношения свободного TIMP и связанного с MMP, если NAC прямо действует на TIMP. Оказалось, что никаких количественных изменений свободного TIMP-1 и TIMP-2, а также их комплексов с MMP в присутствии NAC в КС нет (не показано). Это говорит об отсутствии

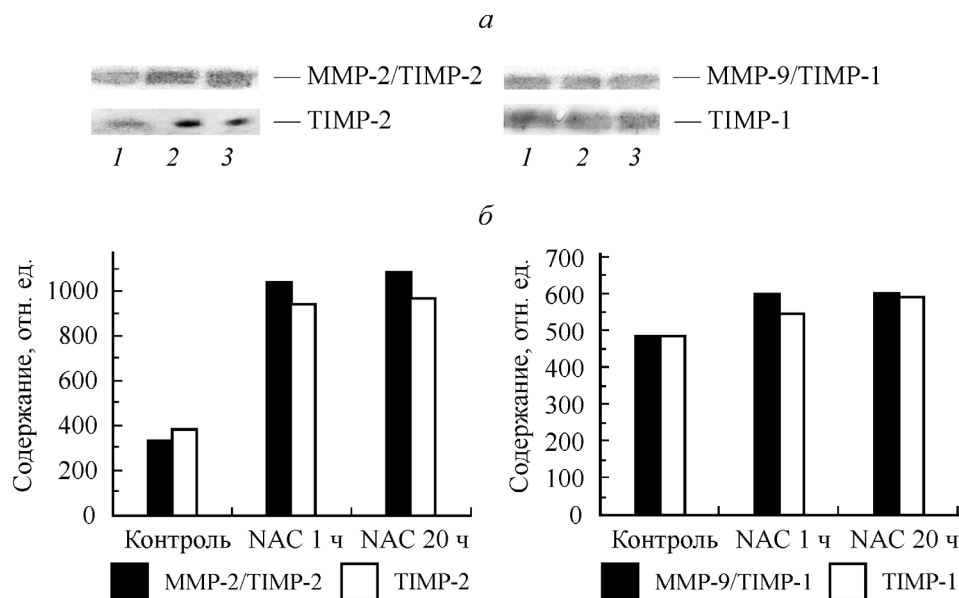


Рис. 3. Содержание тканевых ингибиторов TIMP-1 и TIMP-2 и их комплексов с MMP (MMP-9/TIMP-1 и MMP-2/TIMP-2) в среде с клетками соответственно через 1 и 20 ч после введения 5 мМ NAC.

а — Вестерн-блотинг, дорожки: 1 — контроль, 2 и 3 — после введения NAC соответственно через 1 и 20 ч; б — денситограммы.



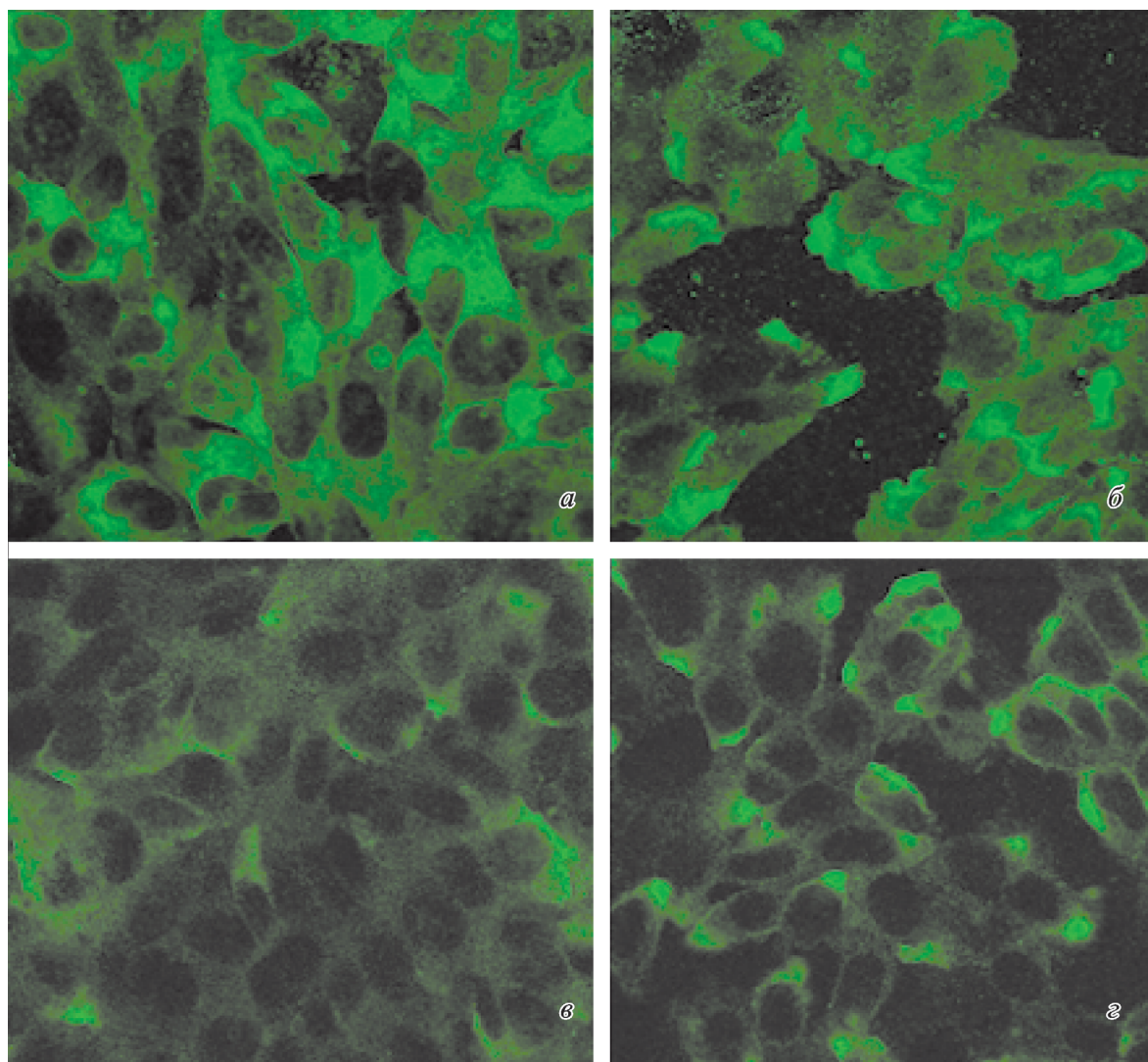


Рис. 4. Изменение распределения свечения коллагена типа I, меченного поликлональными (*а, б*) и моноклональными (*в, г*) антителами, в клетках 3Т3-SV40 в контроле и через 20 ч после действия 5 мМ NAC.

*а, в* — контроль; *б, г* — после введения NAC. Используются поликлональные антитела к коллагену I и моноклональные к коллагенам I, II и III. NAC приводит к перераспределению коллагена ближе к краям клетки (*б*) или концентрации его в определенных локусах (*г*). Конфокальная микроскопия; об. 63×.

прямого влияния антиоксиданта на TIMP и его связь с MMP. Таким образом, NAC в среде с клетками изменяет количественное соотношение между ферментом и ингибитором только в случае MMP-1, MMP-9 и их ингибитора TIMP-1.

Изменение распределения коллагена на поверхности клетки. От активности MMP зависят прежде всего состав и структура внеклеточного матрикса (ВКМ), главным компонентом которого является коллаген. Мы проверили, как действие NAC влияет на количество коллагена, синтезируемого клетками. Рис. 4 показывает коллаген, идентифицируемый с помощью поли- и моноклональных антител к коллагену I, на поверхности клеток. В норме поликлональные антитела связываются и с фрагментами коллагена, образующимися в результате активности MMP-1, и с нефрагментированным коллагеном, уложенным в структуры. Моноклональные антитела метят преимущественно структурированный (фибрилярный) коллаген. Обращают на себя внимание совершенно разные картины распределения антител (и поли-, и моно-

клональных) в контрольных клетках и после действия NAC. У контрольных клеток свечение в основном диффузное, более или менее яркое, но по всей клетке (рис. 4, *а, в*). После действия NAC флуоресценция поликлональных антител наиболее выражена по краям клетки (рис. 4, *б*), а моноклональных — четко ограничена определенными локусами клетки (рис. 4, *г*). Концентрация свечения сопровождается небольшим увеличением яркости (менее 10 % по данным подсчета общей площади свечения (с учетом яркости пикселя) с помощью программы Scilab Enterprises S.A.S 2014). Таким образом, действие NAC приводит к перераспределению коллагена на поверхности клеток.

### Обсуждение

Итак, полученные нами данные говорят о том, что MMP (1, 2, 8 и 9), секретируемые клетками 3Т3-SV40 в среде, являются прямой мишенью антиоксиданта NAC и

быстро теряют свою активность в его присутствии. Совпадение результатов экспериментов, выполненных на клетках и на бесклеточной среде, говорит о прямом (химическом) взаимодействии антиоксиданта с MMP, в результате которого ферменты теряют активность. По данным компьютерного моделирования предполагается, что NAC связывается с цинком в каталитическом сайте фермента, образуя комплекс небелкового тиола с  $Zn^{2+}$  (Pei et al., 2006). Однако возможна и прямая связь NAC с остатком цистеина в пропептидном домене фермента по механизму S-глутатионилирования (Shackelford et al., 2005).

В литературе есть данные, подтверждающие прямое ингибирование MMP-2 и MMP-9 различными антиоксидантами и серосодержащими соединениями. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что NAC ингибирует активность желатиназ MMP-2 и MMP-9 легочных мышечных фибробластов (Wang et al., 2006), в злокачественных клетках (Albini et al., 1995; Morini et al., 1999) и в клетках оболочек эмбриона человека (Weiss et al., 2003). Активность желатиназ прямо ингибируется не только NAC, но и другим SH-содержащим реагентом — восстановленным глутатионом (GSH). Однако GSH может и ингибировать, и активировать MMP в зависимости от клеточного типа, что предполагает определенную структурную специфичность MMP по отношению к действию SH-содержащих реагентов (Tyagi et al., 1996; Bogani et al., 2007).

Мы обнаружили, что в присутствии NAC в среде клеток пропорционально увеличивается количество и TIMP-2, и его комплекса с MMP-2. Наблюдаемые увеличения могут быть реакцией клетки (выбросами) на подавление активностей MMP антиоксидантом. Так или иначе, но количество свободной MMP-2 в итоге сохраняется на прежнем уровне. Однако подобной корреляции нет для MMP-1, MMP-9 и их ингибитора TIMP-1.

Содержание MMP-9 и MMP-1 в среде с клетками при действии NAC уменьшается, а количество TIMP-1 сохраняется на прежнем уровне. Эксперименты с бесклеточной средой показали, что NAC прямо не влияет на активность TIMP. Поэтому можно заключить, что вызываемое NAC изменение соотношения между содержанием MMP-9, MMP-1 и их ингибитором свидетельствует о том, что NAC через внутриклеточные мишени изменяет продукцию MMP-1 и MMP-9. Из данных литературы известно, что NAC дозозависимо в широком диапазоне концентраций (10—30 мМ) действительно может ингибировать образование в клетке MMP-9 (Galis et al., 1998; Radomska-Leoniewska et al., 2010). Авторы объясняют это тем, что антиоксидант NAC ингибирует активность транскрипционного фактора NF-κB, изменяя экспрессию его генов. При этом авторы подчеркивают высокие дозы NAC, которые могут достигать до 100 мМ (Lappas et al., 2003; см. обзор: Sadowska et al., 2007). Заметим, что действие NAC на клетки плеiotропно, но основным является препятствие образованию дисульфидов, вовлеченных в функциональную передачу сигнала, и сдвиг редокс-баланса клетки (см. обзор: Parasassi et al., 2010).

Нарушение баланса между уровнем MMP и ее ингибитором трактуется разными авторами как нарушение, ведущее к реорганизации структуры ВКМ. Так, потеря баланса между MMP-1, MMP-9 и их ингибитором TIMP-1 (увеличение содержания MMP-9 и неизменность содержания TIMP-1) в бронхоальвеолярной жидкости рассматривается как реструктуризация легочной ткани и

развитие патологии (Mautino et al., 1999; Henry et al., 2002).

Известно, что коллагеназа MMP-1 вовлечена в реструктуризацию фибриллярного коллагена, который далее может подвергаться деградации другими MMP. Изменения активности MMP при действии NAC, в первую очередь коллагеназ, могут вызвать реструктуризацию ВКМ за счет нарушения пространственной структуры коллагена. Мы показали, что NAC не только уменьшает активность всех MMP, содержание MMP-1 и MMP-9, но и вызывает перераспределение коллагена I на поверхности клетки. Будучи равномерно распределенным по поверхности клетки в контрольных клетках, он начинает концентрироваться в определенных локусах по краям клетки при действии NAC. Это может быть связано с тем, что NAC изменяет морфологию клетки и реорганизует актиновый цитоскелет (Gamaley et al., 2006; Гамалей и др., 2010). Кроме того, можно полагать, что в результате уменьшения активности MMP-1 и ее содержания уменьшается количество фрагментированного коллагена, а остается только нефрагментированный, собирающийся к краям клетки. Возможно, это места выхода коллагена из клетки на поверхность. Корреляция между активностью MMP-1 и фрагментацией коллагена показана в работе Фишера с сотрудниками (Fisher et al., 2009). Есть данные о том, что при длительном (24 ч) действии на клетку антиоксиданта может измениться синтез клеткой коллагена и других компонентов ВКМ (Zhang et al., 2006; Dooley et al., 2010).

Таким образом, полученные нами данные о том, что действие NAC нарушает баланс между MMP-1, MMP-9 и их ингибитором TIMP-1, а также вызывает реструктуризацию коллагена на поверхности клеток, дают основание предполагать, что мишенью действия этого антиоксиданта могут быть не только MMP в среде клеток, но и гены, ответственные за их синтез. Конечным результатом действия NAC могут быть перестройка ВКМ и изменение свойств клеточной поверхности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00935) и программы президиума 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): 882—886. (Voronkina I. V., Kirpichnikova K. M., Smagina L. V., Gamaley I. A. 2009. Activity of matrix metalloproteinases in normal and transformed mouse fibroblasts exposed to antioxidants. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 3 (1): 56—60.)
- Гамалей И. А., Кирпичникова К. М., Вахромова Е. А., Филатова Н. А. 2010. N-ацетилцистеин уменьшает чувствительность трансформированных и эмбриональных клеток к литическому действию естественных киллерных клеток. Цитология. 52 (7): 555—561. (Gamaley I. A., Kirpichnikova K. M., Vakhromova E. A., Filatova N. A. 2010. N-acetylcysteine reduces susceptibility of transformed and embryonic cells to lytic activity of natural killer cells. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 4 (6): 580—586.)
- 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 дей-



- СТВИЕМ НАС. Цитология. 51 (5) : 398—402. (Filatova N. A., Kirpichnikova K. M., Vahromova E. A., Gamaley I. A. 2009. Effect of alpha-lipoic acid on the sensitivity of transformed fibroblasts to lysis by natural killer cells. Comparison with NAC action. Tsitologiya. 51 (5) : 398—402.)
- Albini A., D'Agostini F., Giunciuglio D., Paglieri I., Balansky R., De Flora S. 1995. Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine. *Int. J. Cancer*. 61:121—129.
- Ardi V. C., Kupriyanova T. A., Deryugina E. I., Quigley J. P. 2007. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *PNAS*. 104 (51) : doi\_10.1073\_pnas.0706438104.
- Baker A. H., Edwards D. R., Murphy G. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115 : 3719—3727.
- Björklund M., Koivunen E. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim. biophys. acta*. 1755 : 37—69.
- Bogani P., Canavesi M., Hagen T. M., Visioli F., Bellosa S. 2007. Thiol supplementation inhibits metalloproteinase activity independent of glutathione status. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363 : 651—655.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Candelario-Jali E., Yang Y., Rosenberg G. A. 2009. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*. 158 : 983—994.
- Cavdar Z., Ozbal S., Celik A., Ergur B., Guneli E., Ural C., Camsari T., Guner G. 2013. The effects of alpha-lipoic acid on MMP-2 and MMP-9 activities in a rat renal ischemia and re-perfusion model. *Biotech. Histochem.* 89 : 304—314
- Curry T. E., Osteen K. G. 2003. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrinol. Rev.* 24 : 428—465.
- Dooley A., Shi-Wen X., Aden N., Tranah T., Desai N., Denton C. P., Abraham D. J., Bruckdorfer R. 2010. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology (Oxford)*. 49 : 2024—2036.
- Dzwonek J., Rylski M., Kaczmarek L. 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett.* 567 : 129—135.
- Fisher G. J., Quan T., Purohit T., Shao Y., Cho M. K., He T., Varani J., Kang S., Voorhees J. J. 2009. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Amer. J. Pathol* 174 : 101—114.
- Galis Z. S., Asanuma K., Godin D., Meng X. 1998. N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells. New target for antioxidant therapy? *Circulation*. 97 : 2445—2453.
- Gamaley I., Efremova T., Kirpichnikova K., Kever L., Komisarchik 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.
- Henry M. T., McMahon K., Mackarel A. J., Prikk K., Sorsa T., Maisi P., Sepper R., FitzGerald M. X., O'Connor C. M. 2002. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *Eur. Respir. J.* 20 : 1220—1227.
- Kolkenbrock H., Hecker-Kia A., Orgel D., Ruppitsch W., Ulbrich N. 1994. Activity of ternary gelatinase A-TIMP-2-matrix metalloproteinase complexes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 375 : 589—596.
- Kolkenbrock H., Orgel D., Hecker-Kia A., Noack W., Ulbrich N. 1991. The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 198 : 775—781.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—683.
- Lai C. F., Seshadri V., Huang K., Shao J. S., Cai J., Vattikuti R., Schumacher A., Loewy A. P., Denhardt D. T., Rittling S. R., Towler D. A. 2006. An osteopontin-NADPH oxidase signaling cascade promotes pro-matrix metalloproteinase 9 activation in aortic mesenchymal cells. *Circ. Res.* 98 : 1479—1489.
- Lappas M., Permezel M., Rice G. 2003. N-acetylcysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor  $\kappa$ B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88 : 1723—1729.
- Lee H. S., Na M. H., Kim W. K. 2010. Alpha-lipoic acid reduces matrix metalloproteinase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr. Res.* 30 : 403—409.
- Mautino G., Henriquet C., Gougat C., Le Cam A., Dayer J. M., Bousquet J., Capony F. 1999. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and loss of correlation with matrix metalloproteinase-9 by macrophages in asthma. *Lab. Invest.* 79 : 39—47.
- Monea S., Lehti K., Keski-Oja J., Mignatti P. 2002. Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 192 : 160—170.
- Morini M., Cai T., Aluigi M. G., Noonan D. M., Masiello L., De Flora S., D'Agostini F., Albini A., Fassina G. 1999. The role of the thiol N-acetylcysteine in the prevention of tumor invasion and angiogenesis. *Int. J. Biol. Markers*. 14 : 68—71.
- Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego: Acad. Press. 61—76.
- Parasassi T., Brunelli R., Costa G., De Spirito M., Krasnowsk E. K., Lundeberg T., Pittaluga E., Ursini F. 2010. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *Sci. World J.* 10 : 1192—1202.
- 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.
- Radomska-Leoeniewska D. M., Skopińska-Różewska E., Janowska-Steifer E., Sobiecka M., Sadowska A. M., Hevelke A., Malejczyk J. 2010. N-acetylcysteine inhibits IL-8 and MMP-9 release and ICAM-1 expression by bronchoalveolar cells from interstitial lung disease patients. *Pharmacol. Rep.* 62 : 131—138.
- Sadowska A. M., Manuel-Y-Keenoy B., De Backer W. A. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant *in vitro* and *in vivo* dose-effects: a review. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 20 : 9—22.
- Shackelford R. E., Heinloth A. N., Heard S., Paules R. S. 2005. Cellular and molecular targets of protein S-glutathiolation. *Antioxid. Redox Signaling*. 7 : 940—950.
- Spingman 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.
- Svineng G., Ravuri C., Rikardsen O., Huseby N.-F., Winberg J.-O. 2008. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase. *Connect Tissue Res.* 49 : 197—202.
- Toth M., Sohail A., Fridman R. 2012. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol. Biol.* 878 : 121—135.
- Tyagi S. C., Kumar S., Borders S. 1996. Reduction-oxidation (redox) state regulation of extracellular matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in cardiac normal and transformed fibroblast cells. *J. Cell. Biochem.* 61 : 139—151.
- 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.
- Vayalil P. K., Olman M., Mutphy-Ulrich J. E., Postlethwait E. M., Liu R.-M. 2005. Glutathione restores collagen degrada-

tion in TGF- $\beta$ -treated fibroblasts by blocking plasminogen activator inhibitor-1 expression and activating plasminogen. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289 : L937—L945.

Wang H. T., Gao J. L., Tian Y. X., Kan Q. 2006. Inhibition of N-acetyl-L-cysteine on expressions of matrix metalloproteinases increased by exposure to silicon dioxide in lung fibroblasts in rats. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 24 : 514—517.

Weiss A., Goldman S., Ben Shlomo I., Eyal 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.

Zhang Q., Kelly A. P., Wang L., French S. W., Tang X., Duong H. S., Messadi D. V., Le A. D. 2006. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways. *J. Invest. Dermatol.* 126 : 2607—2613.

Поступила 19 V 2014

#### ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES OF TRANSFORMED FIBROBLASTS UNDER THE ANTIOXIDANT ACTION

*I. V. Voronkina, E. A. Vakhromova, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, I. A. Gamaley*

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

We have shown that antioxidant N-acetylcysteine (NAC, 2—10 mM) quickly (for 2 hours) and completely inactivates the activity of matrix metalloproteinases (gelatinases MMP-2 and MMP-9, and collagenases MMP-1 and MMP-8) secreted by transformed mouse fibroblasts 3T3-SV40 into the medium. The same MMP inhibition took place in the cell-free conditioned medium of HT-1080 fibroblasts, which suggests a direct chemical interaction between NAC and MMP resulting in the loss of MMP activity. Besides inhibitory effect, NAC decreased MMP-1 and MMP-9 (but not MMP-2) production in the cell medium. However, the level of MMP-1 and MMP-9 inhibitor (TIMP-1) remained normal, indicating a shift in the balance between the enzyme and inhibitor. The correlation between MMP-2 level and tissue enzyme inhibitor TIMP-2 was similar in control and NAC treated cells. At the same time, reorganization of type I collagen at the cell surface occurred. All together permits the conclusion that NAC action results in the extracellular matrix remodeling and changing in cellular functions.

**Key words:** N-acetylcysteine, matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of MMP, extracellular matrix, collagen I.