

## ДЕЙСТВИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ НА КОМПОНЕНТЫ СЕКРЕТОРНОГО ПУТИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© М. С. Вильданова,<sup>1</sup> М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;

<sup>1</sup> электронный адрес: vch41048@mail.ru

Растительные гормоны, являясь регуляторами роста и дифференцировки растений, обладают противоопухолевыми свойствами, причем некоторые из них влияют на секреторную активность, а также синтезируются клетками млекопитающих, выполняя функции провоспалительных цитокинов. В настоящей работе изучали действие абсцизовой и гиббереллиновой кислот на секреторную систему клеток эпидермоидной карциномы человека линии А431 и кератиноцитов человека линии HaCaT. Иммуноцитохимический и морфометрический анализ показал, что при субтоксической концентрации фитогормонов происходят усиление выраженности ЭПР и увеличение площади аппарата Гольджи. Электронно-микроскопическое исследование выявило гипертрофические изменения аппарата Гольджи, связанные с расширением цистерн диктиосом в транс-части при воздействии абсцизовой кислотой, и расширения как цис-части, так и транс-части диктиосом при действии гиббереллиновой кислоты. Анализ уровня общего белкового синтеза с помощью метода Click-iT выявил усиление синтеза белка при действии абсцизовой кислоты только в клетках А431. Таким образом, гипертрофия аппарата Гольджи в этих условиях может свидетельствовать об усилении секреторной активности в клетках. В других вариантах воздействия гипертрофия аппарата Гольджи не связана с усилением синтетической активности клеток, и, следовательно, гипертрофические изменения секреторной системы могут быть признаками развития стресса ЭПР и аппарата Гольджи. Таким образом, морфологически сходный характер реакции клеток, выражающийся в гипертрофии аппарата Гольджи, имеет разную функциональную основу, а молекулярные механизмы индуцируемых в клетках процессов требуют глубокого изучения.

Ключевые слова: аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, растительные гормоны, гиббереллиновая кислота, абсцизовая кислота.

Принятые сокращения: АБК — абсцизовая кислота, ГК — гиббереллиновая кислота, ДТТ — дитиотреитол, УФ — ультрафиолет, ЭПР — эндоплазматический ретикулум, МТТ — 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.

Растительные гормоны — это органические вещества, выделяемые клетками растений и действующие в низкой концентрации как регуляторы роста и дифференцировки. К растительным гормонам относятся ауксин, цитокинины, абсцизины, гиббереллины, жасмоновая кислота и ее производные, салициловая кислота и др. В отличие от гормонов животных, которые выделяются железами внутренней секреции или скоплениями специализированных клеток, к синтезу растительных гормонов потенциально способна любая клетка растений. АБК — изопреноид, который участвует в регуляции перехода растения в состояние покоя в ответ на абиотический и биотический стрессы (Bruzzone et al., 2008; Li et al., 2011). ГК — член семейства гиббереллинов — является гормоном, стимулирующим рост растений. Большинство гиббереллинов — структурно схожие дитерпеноидные кислоты, которые принято обозначать с соответствующим индексом. Наиболее часто в экспериментах используется ГК<sub>3</sub> (Meleigy, Khala, 2009). Растительные гормоны находят широкое применение в сельском хозяйстве, и продукты растительного происхождения, содержащие эти вещества, включаются в пищевую цепь животных и человека. Изу-

чение влияния растительных гормонов и их синтетических производных на клетки животных вызывает большой интерес и в связи с поиском новых природных противоопухолевых препаратов. К таким веществам относятся салициловая кислота, производные жасмонатов, абсцизовой кислоты, брассиностероидов и цитокинины (Abraham et al., 1995; Havlicek et al., 1997; Schwenger et al., 1997; Fingrut, Flescher, 2002; Лазарева и др., 2007; Flescher, 2007; Li et al., 2011). Недавно появились сообщения о влиянии растительных гормонов на секреторную активность животных клеток (Bruzzone et al., 2012). Как известно, патология секреции лежит в основе многих заболеваний, связанных с дисфункцией желез, таких как диабет I и II типов, а также многих иммунных и нейродегенеративных заболеваний (Sugiura, 2013). Поэтому возможности коррекции этих патологий с помощью природных низкомолекулярных агентов требуют детального изучения.

В последнее время повышенный интерес к реакции клеток животных на растительные гормоны связан с тем, что синтез определенных фитогормонов, например АБК, происходит не только у растений, водорослей, цианобак-

терий и грибов, но и у животных и человека. АБК может вырабатываться клетками иммунной и сердечно-сосудистой систем, мезенхимными стволовыми клетками, клетками поджелудочной железы, причем как в физиологических условиях, так и при патологии (Li et al., 2011). В нормальных условиях АБК, синтезированная клетками животных, регулирует рост и развитие клеток, а иммунный ответ на различные стимулы при участии АБК контролируется с помощью сигнальных механизмов, сходных с теми, которые найдены у растений (Scarfi et al., 2008). Кроме этого, АБК является эндогенным провоспалительным цитокином и выделяется клетками млекопитающих в ответ на различные стрессовые факторы. Так, например, в гранулоцитах и кератиноцитах человека при УФ-облучении возрастает внутриклеточная концентрация АБК, а затем происходит ее освобождение из клеток (Bruzzone et al., 2012), что в свою очередь может запускать воспалительные реакции в коже в ответ на облучение. У фибробластов, взятых у больных системным склерозом, добавление АБК значительно уменьшает отложение коллагена, при этом увеличивается активность матриксной металлопротеиназы 1 и уменьшается уровень экспрессии тканевого ингибитора металлопротеиназы (TIMP-1) (Bruzzone et al., 2012). Эти данные указывают на то, что АБК может подавлять синтетическую активность клеток с признаками патологии. Однако ранее этой же группой авторов было показано, что АБК усиливает секрецию инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы человека в ответ на стимуляцию глюкозой (Bruzzone et al., 2008).

Таким образом, некоторые растительные гормоны, например АБК, не только вырабатываются клетками животных, но и выделяются ими во внеклеточную среду, распознаются другими клетками организма и запускают в этих клетках воспалительные реакции. Вышеприведенные данные показывают, что в одних клетках синтетическая и секреторная активность в ответ на действие АБК усиливается, а в других — падает. В связи с этим возникает вопрос о том, какие изменения при этом происходят в клетках-мишенях и зависит ли их характер от клеточно-типа и (или) их патологического состояния.

В связи с вышесказанным целью нашего исследования было изучить реакцию синтетического и секреторного аппарата (ЭПР и аппарата Гольджи) культивируемых нормальных кератиноцитов и опухолевых клеток кожи человека на действие АБК и ее условного антагониста ГК.

## Материал и методика

**Клетки.** Использовали клетки линии A431 (эпидермоидная карцинома человека), полученные из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) и клетки линии HaCaT (иммortalизованные кератиноциты человека), предоставленные д-ром Л. Фонтао (Отдел дерматологии университетской клиники Женевы, Швейцария). Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (FBS), 2 mM L-глутамин и 80 мкг/мл антибиотика гентамицина, в стандартных условиях (37 °C и 5% CO<sub>2</sub>). Клетки снимали с поверхности пластикового сосуда смесью растворов трипсина и Версена (0.2%-ный раствор ЭДТА в фосфатном буфере) в соотношении 1 : 3, высаживали в 96-луночные платы или чашки Петри со стеклами и культивировали в течение 48 ч. Концентрация клеток составляла 100—150 тыс. на 1 мл среды.

Для оценки жизнеспособности с помощью МТТ-теста клетки высаживали в 96-луночную плату по 90 мкл среды с клетками в каждую лунку. Через 48 ч культивирования в каждую лунку добавляли 96%-ный этиловый спирт (контроль к действию растительных гормонов, растворимых в спирте) или спиртовой раствор гормона (АБК или ГК) (Sigma-Aldrich, США) в необходимой конечной концентрации и инкубировали 24 ч. В качестве первого контроля служили клетки, культивировавшиеся в стандартных условиях, в качестве второго — клетки, культивировавшиеся в среде, содержащей 96%-ный этиловый спирт. Затем реактив МТТ (Sigma-Aldrich, США) разводили культуральной средой до концентрации 1.5 мг/мл и добавляли по 20 мкл раствора в каждую лунку (конечная концентрация составляла 0.25 мг/мл). Через 1—2 ч из каждой лунки отбирали среду и добавляли в лунку на 15—30 мин по 60 мкл DMSO (Sigma-Aldrich, США) для растворения гранул образовавшегося формазана. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия). По результатам МТТ-теста в нескольких независимых экспериментах для каждого воздействия была получена выборка (n составляло 4—5), по которой в программе Excel построены гистограммы и вычислено стандартное отклонение от средней величины.

Для иммуноцитохимического окрашивания клетки культивировали в чашках Петри со стеклами в присутствии агентов (АБК или ГК в концентрации 2 мМ) в течение 24 ч, затем фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (MP Biochemical, Франция) в фосфатно-солевом буфере (PBS, Sigma-Aldrich, США), pH 7.2—7.4, и обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X-100 (Serva, Германия) по стандартной методике. Для выявления ЭПР использовали мышинные моноклональные антитела к резидентным белкам KDEL (Abcam, Россия). Для выявления аппарата Гольджи использовали мышинные моноклональные антитела к белку аппарата Гольджи 58K (formiminotransferase cyclodeaminase — FTCD) (Sigma-Aldrich, США). Вторыми антителами служили антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США).

Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия), используя объективы 40×/0.75 PlanNeofluar, 100×/1.25 Fluor и 100×/1.3 AchromPlan. Изображения регистрировали с помощью цифровой камеры CoolSnap<sup>cf</sup> (RoperScientific Inc., США) и обрабатывали с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss Inc., Германия). Кроме того, препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP2 с объективом Leica HCX PL APO 63×/1.4-06 (Leica Microsystem, Германия) и микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) с конфокальным модулем A1 и объективом Apo TIRF 60×/1.49 с масляной иммерсией.

Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Видимую часть аппарата Гольджи, обладающую максимальной яркостью, выделяли в каждой клетке, а затем измеряли площадь выделенной фигуры в отн. ед. По результатам морфометрического анализа нескольких независимых экспериментов получили выборку (n составляло 80—100), для которой в программе Excel вычисляли средние значения, стандартную ошибку и строили гистограммы.

Для электронной микроскопии клетки фиксировали в течение 1 ч 2.5%-ным глутаровым альдеги-

дом (TED PELLA Inc., США), содержащим формалин (MP Biomedicals, Франция) в конечной концентрации 2 %, промывали PBS (Sigma-Aldrich, США), pH 7.2—7.4, и дополнительно контрастировали водным раствором 1%-ного OsO<sub>4</sub>. Обезжизнение и заключение в Эпон 812 проводили по стандартной методике. Ультратонкие срезы залитых в Эпон образцов окрашивали 1.5%-ным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу и исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL), оснащенного цифровой фотокамерой GATAN ES500W и JEM-100B.

Для сравнения интенсивности общего белкового синтеза в контроле и при воздействиях использовали набор реактивов Click-iT ANA Alexa Fluor 488 Protein Synthesis HCS Assay (Invitrogen, США) и проводили эксперимент согласно приложенным протоколам фирмы-производителя. Клетки культивировали в чашках Петри со стеклами в присутствии агентов в течение 24 ч, затем заменяли среду культивирования на среду без L-метионина, содержащую аналог L-метионина L-азидогомоаланин, встраивающийся во вновь синтезируемые белки. Растущую белковую цепь выявляли с помощью клик-реакции между азидом и алкином, конъюгированным с флуоресцентным красителем. Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия), используя объектив 20×/0.75 PlanNeofluar. Интенсивность белкового синтеза определяли по интенсивности флуоресценции препаратов. Изображения регистрировали с помощью цифровой камеры CoolSnap<sub>ef</sub> (RoperScientific Inc., США) и обрабатывали с помощью программ ImageJ.

Контролем ингибирования синтеза белка служила обработка клеток циклогексимидом (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1.5 мМ в течение 1.5 ч. При анализе интенсивностей флуоресценции значение, полученное при обработке циклогексимидом, принимали за ноль. Для индукции стресса ЭПР использовали ДТТ (AppliChem, Германия) в концентрации 4 мМ, который добавляли в среду культивирования на 1 ч. Концентрации циклогексимиды и ДТТ были выбраны из диапазона 1—4 мМ с помощью МТТ-теста.

## Результаты и обсуждение

Для того чтобы установить минимальную действующую концентрацию растительных гормонов, реакцию клеток на АБК и ГК в диапазоне от 500 нМ до 4 мМ исследовали с помощью МТТ-теста. Результаты, представленные на рис. 1, показали отсутствие различий между чистым контролем и контролем со спиртом, поэтому для оценки результатов дальнейших экспериментов использовали только контроль со спиртом. Обнаружили, что добавление АБК или ГК в концентрации 2 мМ к клеткам А431 вызывало гибель не менее 10 % популяции. Такая же концентрация АБК вызывала гибель около 17 % популяции клеток НаСаТ, в то время как в концентрации 2 мМ ГК не влияла на выживаемость этих клеток. Таким образом, АБК в концентрации 2 мМ влияла на выживаемость опухолевых клеток и нормальных кератиноцитов, а ГК в такой же концентрации — только на выживаемость опухолевых клеток. Данную концентрацию растительных гормонов можно считать субтоксической, так как большая часть клеточной популяции сохраняла жизнеспособность, и в этих условиях можно ожи-

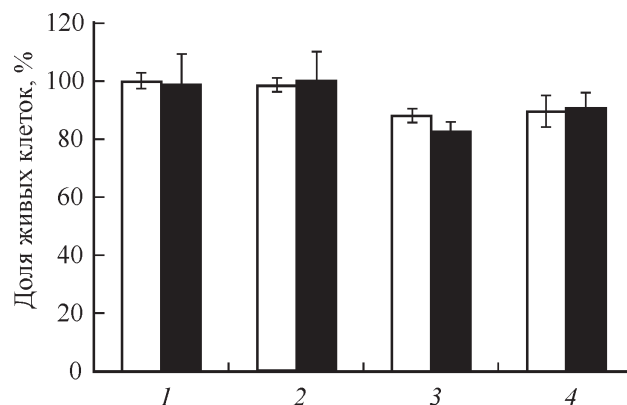


Рис. 1. Жизнеспособность клеток А431 (белые столбцы) и НаСаТ (черные столбцы) при действии АБК и ГК в течение 24 ч по данным МТТ-теста.

1 — чистый контроль, 2 — контроль со спиртом, 3 — АБК, 4 — ГК. Данные одного из трех повторяющихся экспериментов. Показаны средние значения и их стандартное отклонение.

дать проявления действия растительных гормонов на клеточном уровне.

Для того чтобы установить, влияет ли субтоксическая концентрация растительных гормонов на синтетический и секреторный аппарат, клетки А431 и НаСаТ культивировали в течение 24 ч в присутствии 2 мМ АБК или 2 мМ ГК, а затем проводили иммуноцитохимическое выявление ЭПР и аппарата Гольджи.

В присутствии АБК и ГК плотность сети ЭПР в клетках А431 по сравнению с контролем увеличивалась как во всей цитоплазме, так и в околоядерной зоне (рис. 2, I, а—в), причем эффект был по-разному выражен в клетках одной и той же популяции. Это может быть связано с тем, что опухолевые клетки имеют высокую степень гетерогенности по многим фенотипическим и молекулярным характеристикам (Piourolous et al., 2011). В клетках НаСаТ после действия с АБК или ГК по сравнению с контролем увеличивалась плотность сети в околоядерной зоне (рис. 2, I, г—е). Различия между ответами на действие растительных гормонов наблюдали и в клетках этой линии кератиноцитов, что, по-видимому, связано с условиями их культивирования.

АБК и ГК вызывали значительные структурные изменения следующего за ЭПР компартмента секреторной системы — аппарата Гольджи. В клетках А431 это проявлялось в разворачивании компактной ленты аппарата Гольджи, ее расширении и распространении вокруг ядра, набухании отдельных участков ленты (рис. 3, II, а—в). В клетках НаСаТ АБК и ГК вызывали набухание, утолщение отдельных сегментов аппарата Гольджи, их растягивание и распространение вокруг ядра (рис. 3, II, г—е).

Таким образом, в нормальных и опухолевых клетках эпидермоидного происхождения растительные гормоны АБК и ГК вызывают морфологические изменения аппарата Гольджи, которые могут быть связаны с гипертрофией как всего аппарата Гольджи, так и его отдельных субкомпартментов. Для того чтобы подтвердить гипертрофические изменения аппарата Гольджи, с помощью морфометрии проанализировали площадь аппарата Гольджи в двухмерной околоядерной проекции. Анализ показал, что в клетках А431 АБК вызывает увеличение площади аппарата Гольджи в 1.4, а ГК — в 1.2 раза. В клетках НаСаТ после действия АБК и ГК площадь аппарата



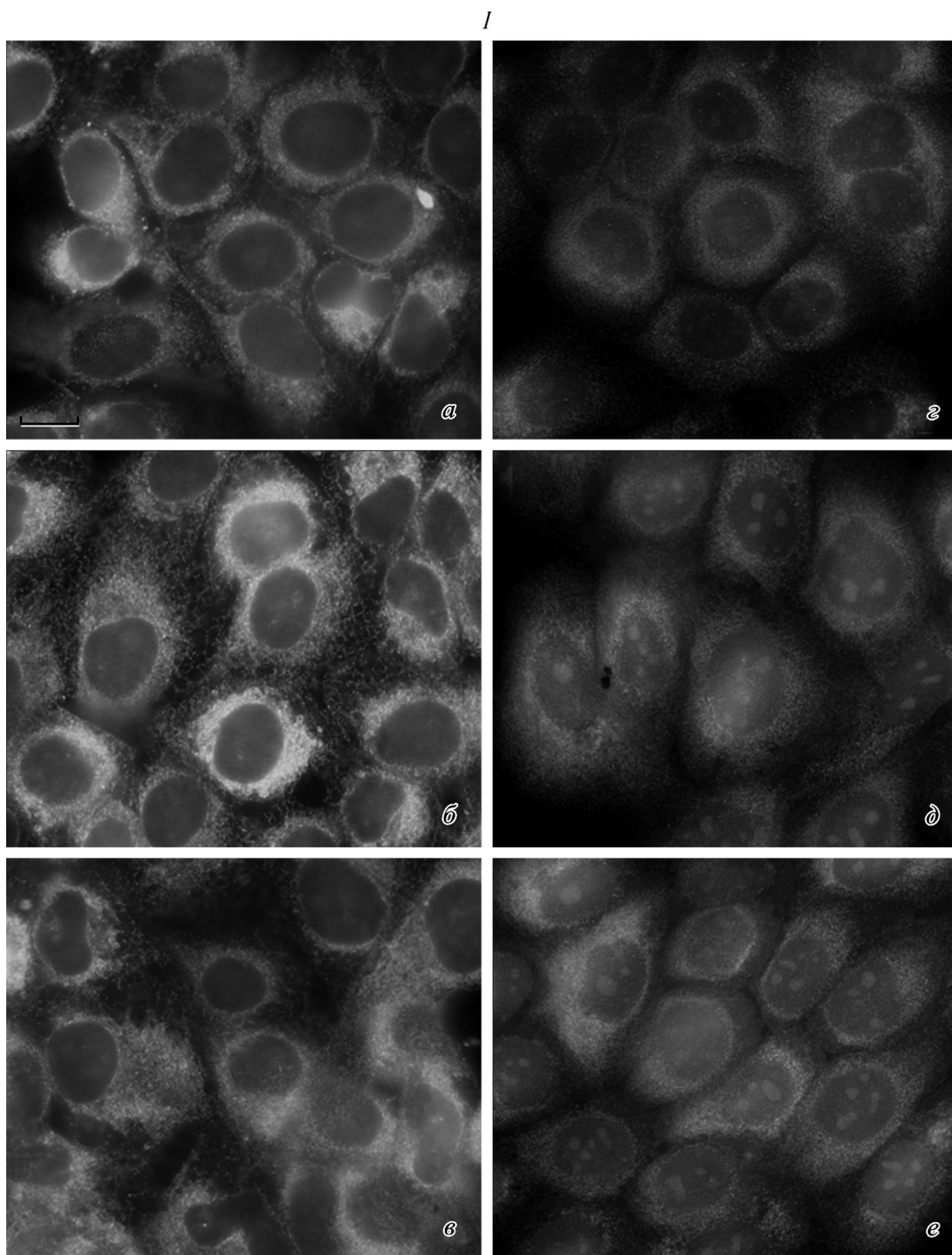


Рис. 2. Сеть ЭПР (I) и аппарат Гольджи (II) в клетках A431 (a—v) и NaCaT (z—e), выявляемые с помощью антител к резидентным белкам KDEL (ЭПР, I) и к белку 58K (аппарат Гольджи, II).

a, z — контроль; б, д — АБК; в, е — ГК. Масштабный отрезок — 10 мкм.

Гольджи возрастала в 1.3 и 1.2 раза соответственно (рис. 3). Таким образом, наблюдаемые морфологические изменения аппарата Гольджи сопровождаются увеличением его размеров и в нормальных, и в опухолевых клетках.

Для того чтобы установить, какие компоненты аппарата Гольджи подвергаются гипертрофическим изменениям, мы исследовали ультраструктуру клеток с помощью электронной микроскопии. Сравнение контрольных клеток A431 (рис. 4, I, a) и клеток, обработанных АБК (рис. 4, I, б), выявило деформацию (искривление) стопок

и отдельных цистерн аппарата Гольджи, а также значительное расширение и увеличение размеров везикул, ассоциированных с транс-частью диктиосом в обработанных клетках. После культивирования с ГК тоже значительно расширялись цистерны в составе диктиосом, причем как в цис-, так и в транс-части (рис. 5, I, в). В клетках NaCaT после культивирования с АБК значительно расширялись транс-части диктиосом и везикулы, ассоциированные с этим участком аппарата Гольджи, появлялись крупные везикулы неправильной формы (рис. 4, II, a—в),



## II

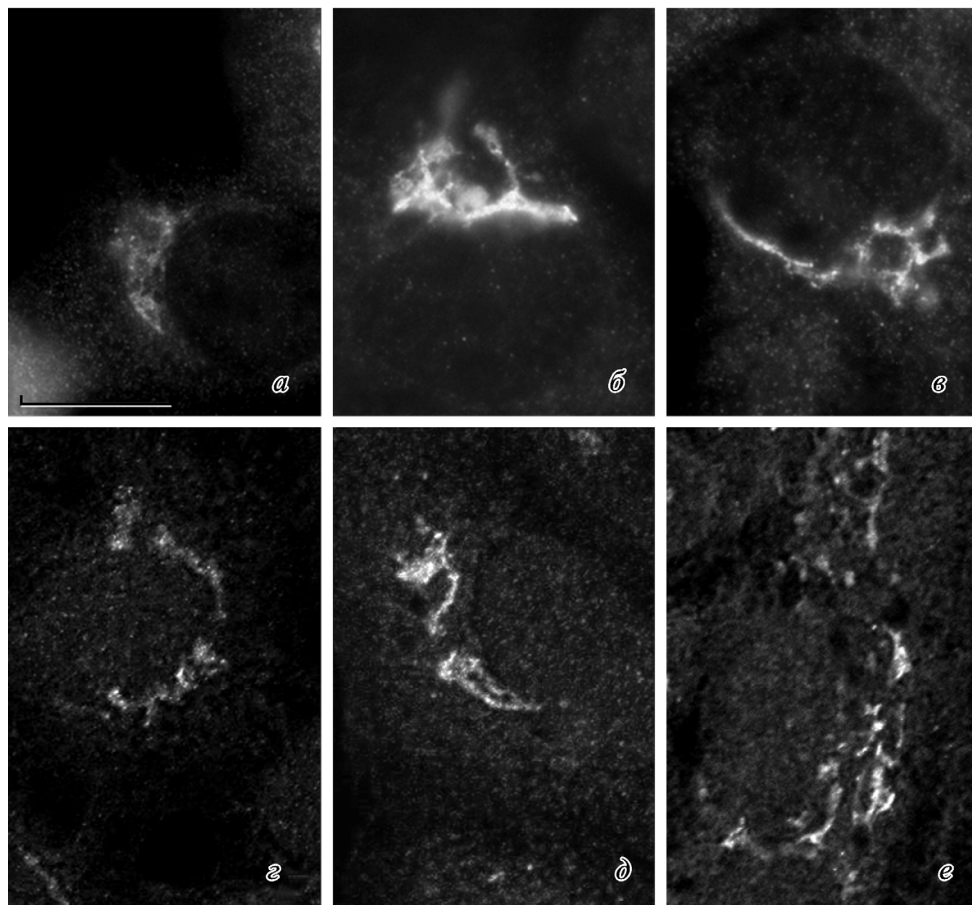


Рис. 2 (продолжение).

а также гигантские аутофагосомы (рис. 5), присутствие которых может свидетельствовать о развитии аутофагии. Культивирование клеток с ГК вызывало расширение цистерн цис- и транс-частей диктиосом, а также появление длинных диктиосом, которых не было в контрольных клетках (рис. 4, II, з).

Таким образом, в клетках А431 и НаСаТ при действии растительных гормонов увеличивается выражен-

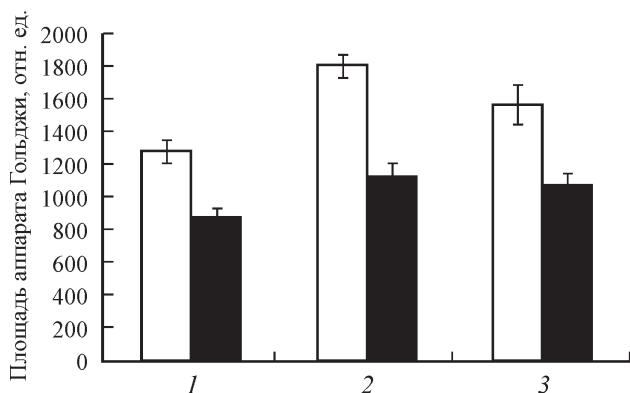


Рис. 3. Изменение площади аппарата Гольджи в клетках А431 (белые столбцы) и НаСаТ (черные столбцы) при действии АБК и ГК.

1 — контроль со спиртом, 2 — АБК, 3 — ГК. Остальные объяснения те же, что и к рис. 1.

ность сети ЭПР и возникают гипертрофические изменения аппарата Гольджи, которые в большей степени затрагивают его транс-часть. Это дает основания полагать, что синтетическая и секреторная системы кератиноцитов являются мишенью для действия растительных гормонов. Изменения в ЭПР и аппарате Гольджи, наблюдаемые в ответ на действие АБК и ГК, могут быть связаны как с усилением синтетической и секреторной активности клеток, так и с нарушением выведения или транспорта продуктов синтеза из аппарата Гольджи, что в свою очередь может свидетельствовать о стрессе ЭПР и (или) аппарата Гольджи. Поэтому далее мы исследовали интенсивность общего белкового синтеза, который осуществляется как на рибосомах ЭПР, так и на свободных рибосомах, с помощью метода Click-iT.

Результаты анализа показали, что в клетках А431 интенсивность белкового синтеза в присутствии АБК возросла в 4.3 раза, тогда как при действии ГК увеличения интенсивности белкового синтеза не было (рис. 6, а). В клетках НаСаТ изменений уровня белкового синтеза по сравнению с контролем не выявили (рис. 6, б).

Обобщая все полученные данные, можно предположить, что в клетках А431 изменения ЭПР и аппарата Гольджи в ответ на действие АБК могут быть связаны с усилением секреторной активности клеток. Изменения ЭПР и аппарата Гольджи в этих клетках в ответ на действие ГК не связаны с усилением синтеза белков, и ГК, возможно, стимулирует стресс этих органелл. В клетках НаСаТ при действии обоих гормонов также нет усиления

I

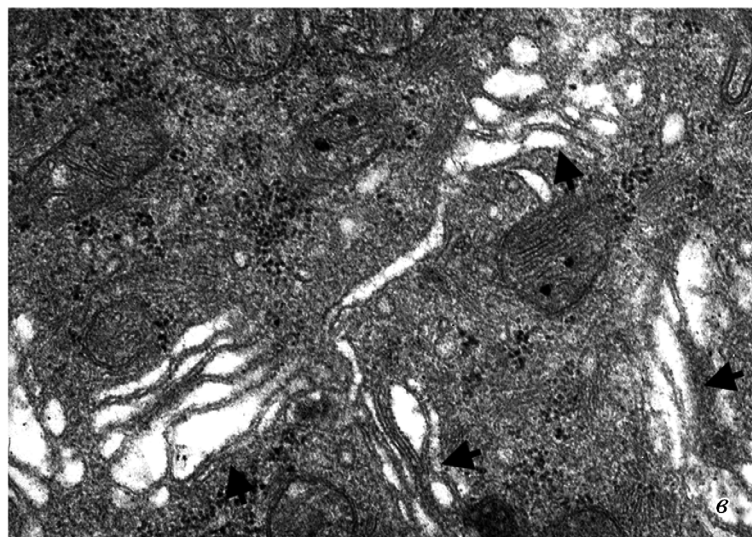
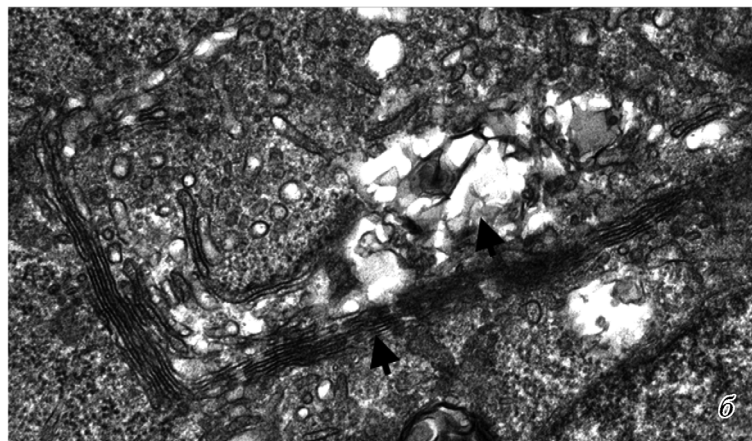
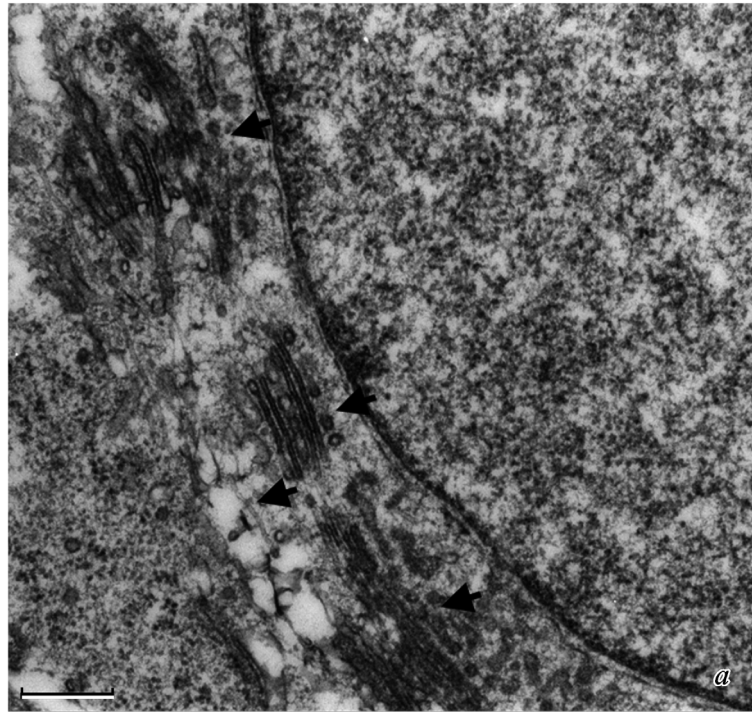


Рис. 4. Ультраструктура аппарата Гольджи в клетках A431 (I) и HaCaT (II). I: a — контроль, б — АБК, в — ГК; II: a, б — контроль, в — АБК, г — ГК. Стрелки указывают на диктиосомы и на расширенные везикулы, ассоциированные с трансчастью диктиосом. Масштабный отрезок — 1 мкм.



II

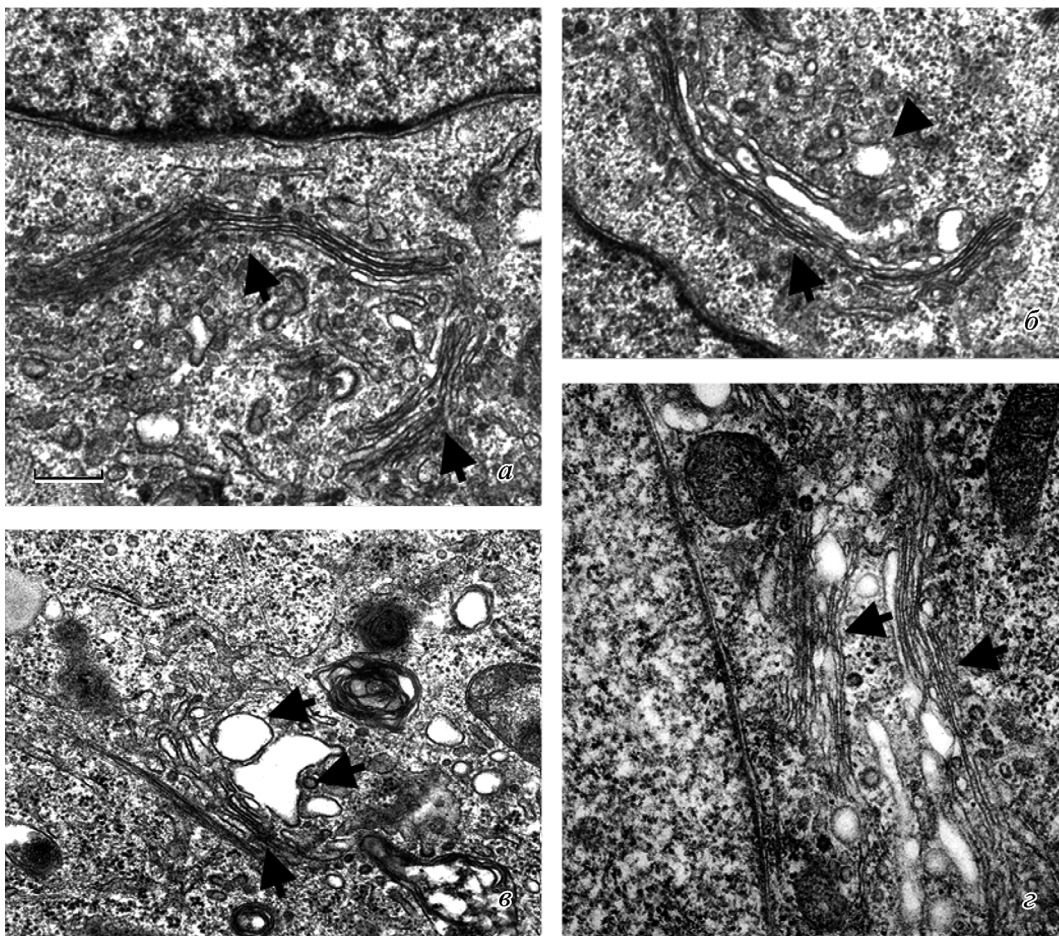


Рис. 4 (продолжение).

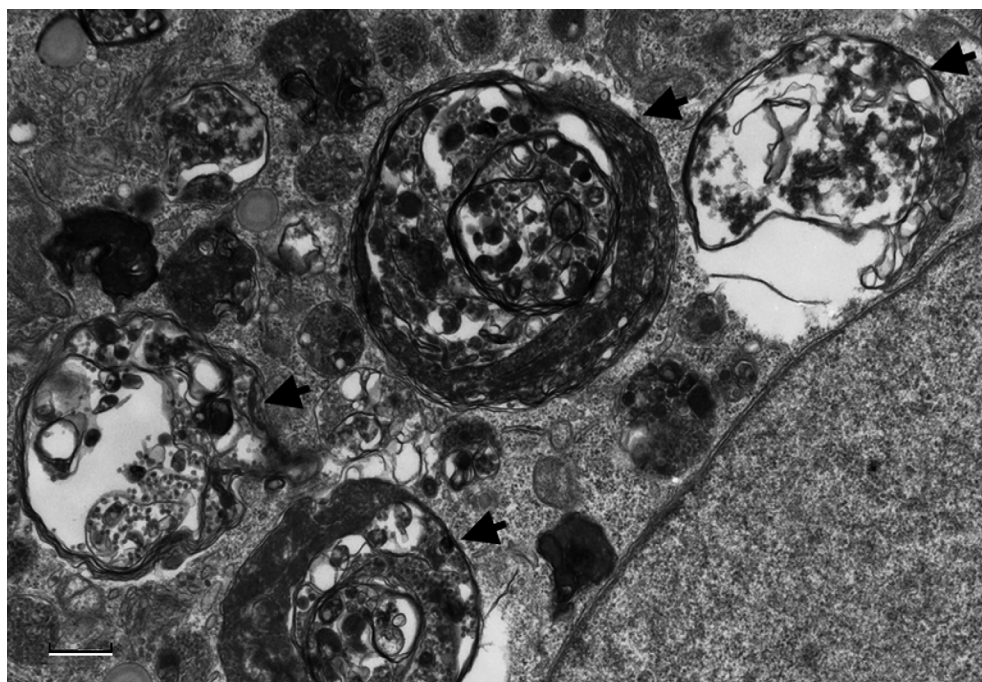


Рис. 5. Ультраструктура аутофагосом в клетках НаСаТ после культивирования в присутствии АБК. Стрелки указывают на аутофагосомы, имеющие сложную слоистую структуру. Масштабный отрезок — 1 мкм.



общего белкового синтеза, что может свидетельствовать об активации стресса ЭПР и аппарата Гольджи.

Для того чтобы проверить, возможно ли усиление белкового синтеза при активации стресса ЭПР, мы проверили действие на клетки ДТТ, который, как известно, является индуктором стресса ЭПР (Kim et al., 2007; Shull et al., 2011; Wang et al., 2011). Использование метода Click-iT показало, что в клетках A431 ДТТ не увеличивает интенсивность белкового синтеза по сравнению с контролем, а в клетках HaCaT уровень белкового синтеза падает даже более значительно, чем при действии ингибитора циклогексимида (рис. 6, в). Полученные данные свидетельствуют о том, что индуцированный стресс ЭПР не сопровождается усилением синтетической активности клеток. Следовательно, в клетках A431 при действии АБК индуцируется повышение белкового синтеза, которое сопровождается активацией секреторной активности аппарата Гольджи. При этом нельзя исключить, что АБК индуцирует возрастание уровня синтеза белков, синтезируемых и на свободных полисомах («домашнего хозяйства»). Однако гипертрофия аппарата Гольджи при отсутствии усиления белкового синтеза, наблюдаемая в опухолевых клетках A431 при действии ГК и в нормальных кератиноцитах при действии АБК и ГК, имеет другие причины.

Как известно, укладка и дополнительная модификация мембранных и секреторных белков происходит в полости гранулярного ЭПР и аппарата Гольджи и является стратегически важной для нормального функционирования клетки. Несвернутые или неправильно свернутые белки подвергаются ЭПР-ассоциированной деградации или повторно проходят цикл сворачивания (Chakrabarti et al., 2011). Накопление неправильно уложенных белков может вызвать стрессовый ответ ЭПР (Chakrabarti et al., 2011; Shull et al., 2011). Несомненно, что стресс ЭПР и стресс аппарата Гольджи тесно связаны между собой, однако механизмы стресса аппарата Гольджи изучены недостаточно.

UPR (unfolded protein response) — универсальная реакция, помогающая эукариотическим клеткам восстановиться после стресса ЭПР (Chakrabarti et al., 2011; Wang et al., 2011; Sugiura, 2013). Если UPR не в состоянии восстановить баланс сворачивания, то развивается апоптоз или аутофагия. У млекопитающих UPR обусловлен активацией трех трансмембранных рецепторов ЭПР — ATF6, IRE1 и PERK, каждый из которых запускает свой сигнальный путь, который может привести как к гибели, так и к адаптации и выживанию (Chakrabarti et al., 2011). Мягкий UPR активируется незначительным стрессом ЭПР. Кератиноциты нижних слоев эпидермиса в ходе дифференцировки в секреторные клетки вышележащих слоев зависят главным образом от мягкого UPR. Жесткий UPR, вызванный серьезным стрессом ЭПР, происходит в патологических условиях и связан со множеством болезней, включая сахарный диабет и болезнь Альцгеймера (Sugiura, 2013).

ДТТ, используемый в нашей работе в качестве дополнительного контроля, запускает стресс ЭПР, нарушая образование дисульфидных связей у белков (Kim et al., 2007). Кроме того, ДТТ активирует eIF2 $\alpha$  — компонент PERK-пути UPR, который может привести как к адаптации клеток после стресса, так и к развитию апоптоза (Wang et al., 2011). Этим объясняется тот факт, что ДТТ оказывает дозозависимый токсический эффект на выживаемость различных клеточных линий. Вероятно, гибель,

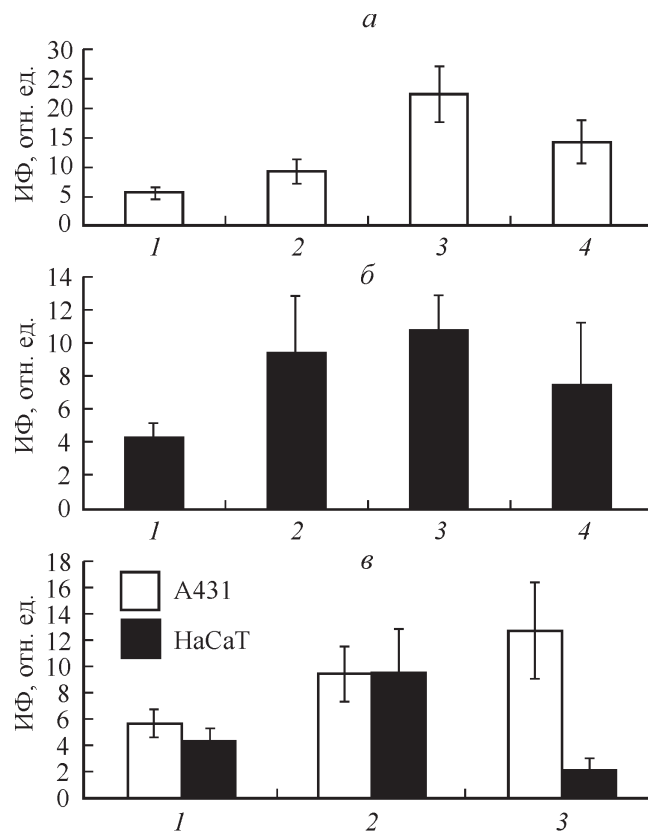


Рис. 6. Изменения интенсивности белкового синтеза в клетках A431 (а) и HaCaT (б) при действии АБК, ГК и ДТТ (в).

а, б: 1 — циклогексимид, 2 — контроль со спиртом, 3 — АБК, 4 — ГК; в: 1 — циклогексимид, 2 — контроль со спиртом, 3 — ДТТ. Представлены данные одного из двух (а), четырех (б) или трех (в) экспериментов, которые дали сходный результат. Показаны средние и их стандартные отклонения. Об интенсивности белкового синтеза судили по интенсивности флуоресценции (ИФ) клеток. Фоновое свечение клеток при действии циклогексимида обусловлено отсутствием его влияния на белковый синтез в митохондриях.

выявляемая в обеих клеточных линиях эпидермоидного происхождения после культивирования с АБК и ГК, также связана с развитием стресса ЭПР и UPR. Кроме того, нормальные кератиноциты, согласно данным МТТ-теста, более устойчивы к действию ГК, хотя на морфологическом уровне у них были выявлены признаки стресса. Вероятно, это связано с тем, что в используемой концентрации фитогормона UPR успешно восстанавливает баланс сворачивания, способствуя адаптации и выживанию нормальных клеток.

Действие ГК на клетки млекопитающих изучено в еще меньшей степени, чем действие АБК. Известно, что ГК индуцирует образование аденокарцином у мышей (El-Mofty et al., 1994), окислительный стресс у крыс (Celik et al., 2007) и, помимо этого, вызывает развитие воспалительных заболеваний кожи и мочевого пузыря у крыс (Erin et al., 2008). Стресс ЭПР и воспалительный ответ могут быть связаны через увеличение продукции активных форм кислорода, выход Ca<sup>2+</sup> из ЭПР, активацию киназы JNK и фактора NF- $\kappa$ B, играющих центральную роль в воспалении (Chakrabarti et al., 2011).

Таким образом, оба растительных гормона (АБК и ГК) в субтоксической концентрации проявили себя как стимуляторы гипертрофических изменений аппарата Гольджи и в нормальных, и в опухолевых клетках кожи

человека. При этом усиление синтетической активности возникает только при действии АБК на культивируемые клетки А431. В остальных случаях гипертрофия аппарата Гольджи не связана с усилением синтеза белков и может быть вызвана нарушением anterograde транспорта секреторируемого материала, что в свою очередь может индуцировать стрессовое состояние ЭПР и аппарата Гольджи.

Если растительные гормоны подавляют anterograde транспортный поток, то тогда мишенью действия растительных гормонов являются регуляторные механизмы, которые контролируют внутриклеточный транспорт. К ним относятся элементы цитоскелета и белки, отвечающие за везикулярный перенос (Anitei, Hoflack, 2011). В дальнейших исследованиях необходимо установить, является ли такая реакция синтетической и секреторной систем специфической реакцией клеток эпидермального происхождения или аналогичные изменения проявляются в других клетках. Возникает вопрос о том, какие именно продукты синтезируются клетками при действии АБК и ведет ли это к нормализации функций клеток с признаками патологии. Кроме этого, индукция гипертрофии аппарата Гольджи с помощью АБК и ГК может свидетельствовать о том, что эти соединения относятся к стимуляторам стресса аппарата Гольджи. В настоящее время известны такие стимуляторы стресса аппарата Гольджи, как монензин и нигерицин — вещества, ослабляющие деятельность аппарата Гольджи и стимулирующие экспрессию генов, вовлеченных в его функционирование (Shull et al., 2011), хлорокин — слабое основание, подавляющее гликозилирование в аппарате Гольджи (Shull et al., 2011), а также стимуляторы стресса ЭПР — ДТТ, туникамицин и тапсигаргин, вызывающие аккумуляцию неправильно свернутых белков (Missiaen et al., 2007; Sugiura, 2013).

Кроме этого, нарушение структуры аппарата Гольджи является характеристическим признаком многих нейродегенеративных заболеваний и возникает при апоптозе. Поэтому современная концепция «стресса аппарата Гольджи» подразумевает не только биохимические, но и структурные (морфологические) нарушения аппарата Гольджи, которые в свою очередь указывают на то, что аппарат Гольджи может не только воспринимать, но и преобразовывать и передавать стрессовые сигналы (Ji et al., 2013).

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что морфологически сходный характер ответа клеток на фитогормоны, выражающийся в гипертрофии аппарата Гольджи, имеет разную функциональную основу, а молекулярные механизмы индуцируемых в клетках процессов требуют глубокого изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01518-а).

Авторы выражают глубокую благодарность И. И. Кирееву (кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова) за помощь в компьютерной обработке данных и П. А. Иванову (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова) за помощь в постановке экспериментов методом Click-iT.

## Список литературы

- Лазарева Е. М., Мурашева М. И., Курьянов Г. И., Поляков В. Ю., Малеванная Н. Н. 2007. Анализ действия эпибрасинолида на цитокINETические параметры культивируемых клеток человека. В кн.: Полифункциональность действия брасиностероидов. М.: НЭСТ-М. 336—348. (Lazareva E. M., Murasheva M. I., Kirjanov G. I., Poljakov V. Yu., Malevannaja N. N. 2007. Analysis of the effect of the epibrassinolide on cytokinetic parameters of cultivated human cells. In: Multifunctional action of brassinosteroids. Moscow: NEST-M. 336—348.)
- Abraham R. T., Acquarone M., Andersen A., Asens, A., Bell, R., Berge, F., Bergounioux C., Brunn G., Buquet-Fagot C., Fagot D. 1995. Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell.* 83 : 105—120.
- Anitei M., Hoflack B. 2011. Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat. Cell Biol.* 14 : 11—19.
- Bruzzo S., Battaglia F., Mannino E., Parodi A., Fruscione F., Basile G., Salis A., Sturla L., Negri S., Kalli F., Stringara S., Filaci G., Zocchi E., Fenoglio D. 2012. Abscisic acid ameliorates the systemic sclerosis fibroblast phenotype *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422 : 70—74.
- Bruzzo S., Bodrato N., Usai C., Guida L., Moreschi I., Nano R., Antonioli B., Fruscione F., Magnone M., Scarfi S., De Flora A., Zocchi E. 2008. Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. *J. Biol. Chem.* 283 : 1888—1897.
- Celik I., Tuluze Y., Isik I. 2007. Abscisic acid and gibberellic acid cause increased lipid peroxidation and fluctuated antioxidant defense systems of various tissues in rats. *J. Hazard Mater.* 148 : 623—629.
- Chakrabarti A., Chen A., Varner J. 2011. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol. Bioeng.* 108 : 2777—2793.
- El-Mofty M. M., Sakr S. A., Rizk A. M., Moussa E. A. 1994. Carcinogenic effect of gibberellin A3 in Swiss albino mice. *Nutr. Cancer.* 21 : 183—190.
- Erin N., Afacan B., Ersoy Y., Ercan F., Balci M. K. 2008. Gibberellic acid, a plant growth regulator, increases mast cell recruitment and alters Substance P levels. *Toxicology.* 254 : 81—85.
- Fingrut O., Flescher E. 2002. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. *Leukemia.* 16 : 608—616.
- Flescher E. 2007. Jasmonates in cancer therapy. *Jasm. Cancer Lett.* 245 : 1—10.
- Havlicek L., Hanus J., Vesely J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. 1997. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem.* 40 : 408—412.
- Iliopoulos D., Hirsch H. A., Wang G., Struhl K. 2011. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 1397—1402.
- Ji G., Ji H., Mo X., Li T., Yu Y., Hu Z. 2013. The role of GRASPs in morphological alterations of Golgi apparatus: mechanisms and effects. *Rev. Neurosci.* 24 : 485—497.
- Kim H. S., Kong K. A., Chung H., Park S., Kim M. H. 2007. ER stress induces the expression of Jpk, which inhibits cell cycle progression in F9 teratocarcinoma cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1095 : 76—81.
- Li H. H., Hao R. L., Wu S. S., Guo P. C., Chen C. J., Pan L. P., Ni H. 2011. Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochem. Pharmacol.* 82 : 701—712.
- Meleigy S., Khalaf M. 2009. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge. *Bioresour. Technol.* 100 : 374—379.

Missiaen L., Dode L., Vanoevelen J., Raeymaekers L., Wuytack F. 2007. Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*. 41 : 405—416.

Scarfi S., Ferraris C., Fruscione F., Fresia C., Guida L., Bruzzone S., Usai C., Parodi A., Millo E., Salis A., Burastero G., De Flora A., Zocchi E. 2008. Cyclic ADP-ribose-mediated expansion and stimulation of human mesenchymal stem cells by the plant hormone abscisic acid. *Stem Cells*. 26 : 2855—2864.

Schwenger P., Bellosta P., Vietor I., Basilico C., Skolnik E. Y., Vilcek J. 1997. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 94 : 2869—2873.

Shull G. E., Miller M. L., Prasad V. 2011. Secretory pathway stress responses as possible mechanisms of disease involving Golgi Ca<sup>2+</sup> pump dysfunction. *Biofactors*. 37 : 150—158.

Sugiura K. 2013. Unfolded protein response in keratinocytes: impact on normal and abnormal keratinization. *J. Dermatol. Sci.* 69 : 181—186.

Wang C. T., Jetzt A. E., Cheng J. S., Cohick W. S. 2011. Inhibition of the unfolded protein response by ricin a-chain enhances its cytotoxicity in mammalian cells. *Toxins (Basel)*. 3 : 453—468.

Поступила 24 II 2014

## EFFECT OF PLANT HORMONES ON THE COMPONENTS OF SECRETORY PATHWAY IN HUMAN NORMAL AND TUMOR CELLS

M. S. Vildanova,<sup>1</sup> M. A. Savitskaya, G. E. Onishchenko, E. A. Smirnova

M. V. Lomonosov Moscow State University;

<sup>1</sup> e-mail: vch41048@mail.ru

Plant hormones play a key role in plant growth and differentiation. Many hormones are known as potential antitumor agents, yet others appear to affect the secretory activity and are produced by mammalian cells as pro-inflammatory cytokines. The goal of this research was to study the effect of abscisic and gibberellic acids on the secretory system of human cultured epidermoid carcinoma cells A431 and keratinocytes HaCat. Immunocytochemical and morphometric analysis demonstrated that subtoxic concentration of plant hormones induced the broadening of the ER network and increased the size of Golgi complex. Electron microscopy studies confirmed the hypertrophic changes of the Golgi apparatus, specifically, the swelling of cisternae in the trans-compartment of dictyosomes after exposure to abscisic acid, and swelling of cis- and trans-compartment of dictyosomes after exposure to abscisic acid, and swelling of cis- and trans-compartments of dictyosomes after exposure to gibberellic acid. Using of Click-iT technique allowed to detect the elevation of the total protein synthesis only in A431 cells exposed to abscisic acid. Cumulative data suggests that, under these conditions, the hypertrophy of Golgi apparatus may reflect the enhanced secretory activity of cells. In other experiments, the hypertrophy of Golgi is not related to increased protein synthesis and therefore may suggest the stress-related changes of ER and Golgi apparatus. Our results demonstrate that morphologically similar reaction of cellular organelles, such as hypertrophy of Golgi apparatus, is the result of different functional activities, and that molecular mechanisms underlying the changes induced in cells need further investigations.

**Key words:** Golgi apparatus, plant hormones, abscisic acid, gibberellic acid.