

## ФОРМА КЛЕТОК И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЛИТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИОКСИДАНТОВ

© К. М. Курпичникова, Ю. П. Петров, Н. А. Филатова, И. А. Гамалей<sup>1</sup>

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

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

В настоящей работе предпринята попытка оценить влияние поверхностных морфологических изменений клетки на ее функциональную активность при действии антиоксидантов N-ацетилцистеина (NAC) и альфа-липоевой кислоты (ALA). Показателем морфологических изменений (формы) служила площадь клетки, а функциональных — чувствительность клеток к литической активности естественных киллерных клеток (ЕКК). Показали, что введение в среду трансформированных фибробластов 3T3-SV40 NAC или ALA вызывает быстрые изменения площади и формы клеток. Параллельно постепенно и значительно уменьшается чувствительность клеток к литической активности ЕКК. Далее сравнили эффекты NAC и ALA с действием других агентов (не антиоксидантов) на эти же показатели. Агенты выбирали так, чтобы их действие хотя бы по одному параметру совпадало с действием антиоксидантов. Ими были латрункулин B, дезорганизующий актиновые нити (как и оба антиоксиданта), вещество OTZ, понижающее уровень АФК в клетке (как и NAC), ингибитор синтеза глутатиона BSO, повышающий уровень АФК в клетке (как и ALA), антитела к желатиназам MMP-2 и MMP-9, инактивирующие их (как и оба антиоксиданта). Результаты показывают, что изменение морфологического показателя коррелирует с изменением функциональной активности клеток 3T3-SV40 (чувствительностью к ЕКК), и свидетельствуют о том, что геометрия поверхности клетки может быть функциональным индикатором ее реакции на действие антиоксиданта.

**Ключевые слова:** морфология поверхности, естественные киллерные клетки, антиоксиданты NAC и ALA, латрункулин B, OTZ, BSO, антитела к MMP-2 и MMP-9.

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода, MMP — матриксные металлопротеазы, ALA — альфа-липоевая кислота, BSO — DL-бутионин-S,R-сульфоксимин, NAC — N-ацетилцистеин, OTZ — (-)-2-оксо-4-тиазолидинкарбоксильная кислота.

В настоящее время известно, что деформации клетки (изменения формы) влияют на ее поведение и судьбу. Разными авторами показано, что механическое растяжение или сжатие клетки под действием микроокружения (например, изменения жесткости и геометрии внеклеточного матрикса — ВКМ) и соседних клеток может включать внутриклеточные сигнальные пути, менять экспрессию генов и в конечном итоге — функции клетки (Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012; Hao et al., 2014).

Исследуя действие антиоксидантов N-ацетилцистеина (NAC) и альфа-липоевой кислоты (ALA) на разные параметры трансформированных мышечных фибробластов 3T3-SV40, мы обнаружили изменения морфологии клеток и реорганизацию структур их цитоскелета (Ефремова и др., 2004; Gamaley et al., 2006). Кроме того, NAC и ALA в межклеточной среде изменяют активности матриксных металлопротеаз — коллагеназ (MMP-1 и MMP-8) и желатиназ (MMP-2 и MMP-9), в результате чего происходит реорганизация коллагена, основного компонента ВКМ на поверхности клетки (Воронкина и др., 2014). Однако ALA в отличие от NAC действует прооксидантно, повышая уровень АФК в клетке, несмотря на свою способность поглощать разные радикалы (Люблинская и др., 2013). Все эти изменения включены в цепь событий, которые в итоге

меняют функционирование клетки, в частности ее взаимодействие с бактериями (Gamaley et al., 2006; Bozhokina et al., 2013, 2014) и естественными киллерными клетками (ЕКК) (Филатова и др., 2008, 2009). В основе проникновения в клетку бактерий (Цаплина, 2013) или лизиса ее ЕКК (Long, Rajagopalan, 2002; Moretta, Moretta, 2004; Takeda, Okumura, 2004) лежит взаимодействие поверхностных структур клетки-мишени с клеткой-эффектором. Оно выражается в узнавании бактерией или ЕКК на поверхности клетки-мишени определенных детерминант, в образовании контакта и активации определенных сигнальных каскадов, приводящих клетку-мишень соответственно к бактериальному заражению или лизису. Полной ясности в понимании механизмов обоих процессов нет.

На основании предыдущих работ мы предположили, что в основе изменений чувствительности клеток к лизису ЕКК, а также к бактериальной инвазии при действии антиоксидантов могут лежать изменения в сигнальных каскадах клетки, происходящие в результате структурных изменений клеточной поверхности и реорганизации ВКМ (Gamaley et al., 2006; Гамалей и др., 2010; Bozhokina et al., 2013, 2014; Воронкина и др., 2014).

В связи с этим предположением в настоящей работе предпринята попытка оценить вклад поверхностных мор-

фологических изменений клетки в изменение ее функциональной активности. Показателем морфологических изменений служила площадь клетки, а функциональных — чувствительность клеток к литическому действию ЕКК. Сравнивали действие (на оба параметра клетки) антиоксидантов NAC и ALA с действием ряда других агентов, не являющихся антиоксидантами, но эффекты которых хотя бы частично совпадали с эффектами NAC и ALA. Ими были латрункулин *B*, дезорганизующий актиновые нити (как и оба антиоксиданта), (-)-2-оксо-4-тиазолидинкарбокислотная кислота (OTZ), понижающая уровень АФК в клетке (как и NAC), ингибитор синтеза глутатиона DL-бутионин-S,R-сульфоксимин (BSO), повышающий уровень АФК в клетке (как и ALA), антитела к желатиназам MMP-2 и MMP-9, инактивирующие их активности (как и оба антиоксиданта).

### Материал и методика

**Клетки.** Использовали эмбриональные мышечные фибробласты линии Balb/3T3, трансформированные вирусом SV40 (клетки постоянной линии 3T3-SV40). Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки, до образования монослоя. Плотность клеток при посеве составляла  $5 \cdot 10^5$  кл./мл. Эксперименты проводили на клетках, находящихся в экспоненциальной фазе роста. Все используемые агенты готовили непосредственно перед экспериментом и вводили в среду культивирования клеток до необходимой конечной концентрации. Перед введением в среду маточного раствора антиоксидантов NAC или ALA величину их pH доводили до значения 7.0. Кроме того, использовали мышечные моноклональные антитела против MMP-2 и MMP-9 человека (в разведении 1 : 1000), ингибитор синтеза глутатиона BSO (10 мкМ), тиолсодержащее вещество OTZ (5 мМ) и латрункулин *B* (200—500 нМ).

Изменения формы поверхности клеток регистрировали с помощью микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованного устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками (поддержания температуры, влажности и CO<sub>2</sub>). Регистрацию изображений проводили в режиме цейтраферной съемки с 5-минутным интервалом между кадрами. Использовали объектив Plan-Neofluar 20×/0.4 и цифровую камеру AxioCam HRm с разрешением 1388×1040 пикселей. Метод наблюдения — дифференциальный интерференционный контраст, адаптированный для работы с пластиком (PlastDIC). Заданные условия эксперимента контролировались автоматически программой AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Чашку Петри с клетками помещали на столик микроскопа, записывали изображения клеток сначала в течение 5—10 мин, затем в среду вводили одно из испытываемых веществ и продолжали запись изображений в течение 1 ч. Для количественного анализа использовали отдельные изображения, записанные в формате JPEG. Обработку полученных изображений выполняли с помощью программы ImageJ 1.49t (Rasband W. S., ImageJ U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997—2015). В качестве основного количественного показателя для оценки размера клеток использовали параметр Area — площадь

поверхности, проецируемой клеткой на подложку, измененную в пикселях, и ее периметр. Каждый эксперимент повторяли трижды. На каждом полученном изображении анализировали по 100 клеток из разных участков монослоя. Данные усредняли и выражали средним значением и их ошибкой. Для статистической обработки данных использовали пакет «Анализ данных» Excel 2007 (MS Corporation, США). Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при  $P < 0.05$ .

Естественную киллерную активность с пленоцитов (клеток-эффекторов) оценивали с помощью <sup>3</sup>H-уридинового цитотоксического теста (Hashimoto, Sudo, 1971) в нашей модификации (Филатова и др., 2008). Клетки-эффекторы выделяли из селезенки интактных мышшей-самцов линии СЗНА массой 18—20 г, полученных из питомника «Рапполово» РАН (Санкт-Петербург). Из селезенки готовили клеточные суспензии, освобожденные от эритроцитов с помощью осмотического шока, и считали в камере Горяева количество ядросодержащих клеток — спленоцитов. Клетки-мишени (3T3-SV40) метили <sup>3</sup>H-уридином, добавляя его в среду одновременно с агентом, после чего клетки отмывали от остатков <sup>3</sup>H-уридина и агента. Соотношение эффекторов и мишеней составляло 20 : 1. Цитотоксическую активность ЕКК определяли в отсутствие агента. Уровень естественной киллерной активности оценивали с помощью цитотоксического индекса (ЦИ), отражающего долю погибших клеток в %. Каждый эксперимент повторяли трижды. Результаты выражали средними значениями и их ошибкой. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при  $P < 0.05$ .

**Реактивы:** культуральная среда ДМЕМ и эмбриональная сыворотка (Биолот, Россия); NAC, ALA, BSO, OTZ и латрункулин *B* (Sigma, США); моноклональные антитела против MMP-2 и MMP-9 человека (Chemicon Int. Co., США, номера по каталогу соответственно MAB13407 и MAB13416); <sup>3</sup>H-уридин (Радиевый институт, Москва).

### Результаты и обсуждение

Чувствительность клеток к действию ЕКК. Сравнительный анализ влияния антиоксидантов ALA (1.25 мМ) и NAC (10 мМ) на чувствительность клеток 3T3-SV40 к действию ЕКК показал, что оно неодинаково. ALA быстро и обратимо уменьшает чувствительность клеток к действию ЕКК, а NAC приводит к полной потере этой чувствительности, но не прямо, а лишь после удаления его из среды (Филатова и др., 2008, 2009). После удаления NAC чувствительность начинает восстанавливаться спустя не менее 2 сут. Оба антиоксиданта увеличивают инвазию бактерий в эти клетки (Bozhokina et al., 2013, 2014), что говорит о том, что антиоксиданты изменяют характер взаимодействия клетки-мишени и атакующей клетки. Поэтому, несмотря на не прямое действие, мы относим NAC к агентам, изменяющим свойства клеточной поверхности. Изменение чувствительности клеток при действии NAC и ALA показано в таблице.

Изменение площади клеток при действии антиоксидантов. Сравнительный анализ изменений периметра клетки и ее площади при действии агентов показал, что динамика их изменений одинакова, поэтому мы приводим данные только по изменению площади клеток (Area, параметр A). Рис. 1 показывает динамику

## Влияние обработки разными агентами клеток 3T3-SV40 на их чувствительность к действию ЕКК

Агент	Цитотоксический индекс (ЦИ, %)	Литературный источник
NAC 10 мМ, 18 ч	30.2 ± 3.0 (31.8 ± 2.4)	Настоящая работа
18 ч после удаления NAC	4.6 ± 2.4 (31.8 ± 2.4) <sup>a</sup>	
NAC 10 мМ, 2 ч	31.2 ± 2.6 (32.8 ± 3.8)	» »
18 ч после удаления NAC	10.52 ± 2.5 (32.8 ± 3.8) <sup>a</sup>	
ALA 1.25 мМ, 18 ч	9.8 ± 1.6 (28.8 ± 4.6)	Филатова и др., 2009
Латрункулин В, 500 нМ, 2 ч	5.3 ± 2.3 (27.6 ± 1.5) <sup>a</sup>	Филатова и др., 2008;
200 нМ, 2 ч	16.0 ± 1.7 (26.6 ± 1.5) <sup>a</sup>	настоящая работа
AT-MMP-2, 1 ч	12.9 ± 3.9 (28.8 ± 4.6) <sup>a</sup>	Филатова и др., 2008
AT-MMP-9, 1 ч	28.8 ± 4.6 (28.6 ± 4.3)	То же
OTZ 5 мМ, 18 ч	31.0 ± 3.1 (29.3 ± 2.1)	Настоящая работа
BSO, 1 мкМ, 18 ч	36.1 ± 4.6 (32.4 ± 6.2)	» »

Примечание. Удаление из среды клеток антител к MMP-2 и MMP-9 (AT-MMP-2 и AT-MMP-9 соответственно), BSO или OTZ не изменяло ЦИ. В скобках показаны контрольные значения ЦИ (без предобработки агентом).  
<sup>a</sup> Достоверность различий с контролем при  $P < 0.05$  (по  $t$ -критерию Стьюдента).

уменьшения площади клетки в течение 1.5 ч после добавления антиоксиданта NAC (рис. 1, а) или ALA (рис. 1, б). Видно, что изменение площади при действии этих антиоксидантов — процесс не монотонный и включает в себя разные стадии со своими закономерностями.

Введение NAC в ростовую среду быстро и резко уменьшает размер клетки в течение первых 10—15 мин (рис. 1, а). Далее характер зависимости резко меняется, площадь несколько увеличивается, но надолго остается значительно меньше, чем до введения агента. Действие ALA тоже уменьшает размеры клетки, хотя кривая динамики площади клетки выглядит совсем иначе. Изменения более медленные, чем в случае с NAC. Значительные уменьшения параметра клеток происходят в первые 30 мин, а в течение следующего часа изменений почти нет. Кривые изменения параметра А, записанные в течение 2—3 ч, имеют несколько изломов (не показано), что свидетельствует о том, что в основе изменений при действии обоих агентов лежит не один процесс. Заметим, что в этих экспериментах мы не синхронизировали клетки (как и в экспериментах с ЕКК) и при оценке параметра А

исключали клетки, которые за время наблюдения успевали разделиться (если такие клетки попадали в поле зрения).

Для корректного сравнения действия антиоксидантов мы анализировали и сравнивали только начальные изменения параметра А, которые (согласно рис. 1, а, б) в первом приближении можно описать прямой линией. Временной интервал этого отрезка для NAC и ALA — приблизительно 30 мин. Эти участки показаны на рис. 2, а, б: точки — экспериментальные значения, соответствующие рис. 1, линии — это линейные зависимости, описывающие экспериментальные точки согласно уравнению линейной зависимости  $y = ax + b$ . Видно, что полученные точки вполне хорошо описываются прямой линией в выбранном временном интервале.

При сравнении двух прямых на рис. 2 видно, что они различаются углом наклона (эквивалента коэффициента  $a$  в уравнении линейной зависимости). Этот угол для разных групп клеток одной популяции и разных экспериментов варьирует и лежит в пределах значений  $-5$ — $(-9)$  для NAC и  $-11$ — $(-4)$  для ALA. Угол наклона тем больше,

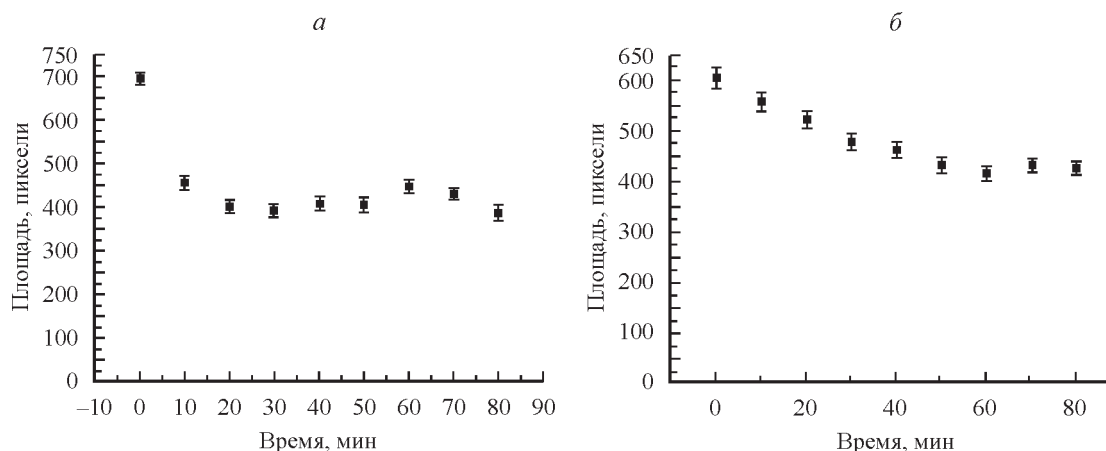


Рис. 1. Изменение площади клеток 3T3-SV40 при действии антиоксиданта N-ацетилцистеина (NAC, а) и альфа-липоевой кислоты (ALA, б).

Агенты в концентрациях 10 (NAC) и 1.25 (ALA) мМ введены в среду с клетками в момент времени «0». Цейтраферная съемка на микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Здесь и на всех рисунках приведены средние значения и их ошибки для 100 клеток из разных участков монослоя в одном из 3—5 повторяющихся экспериментов.

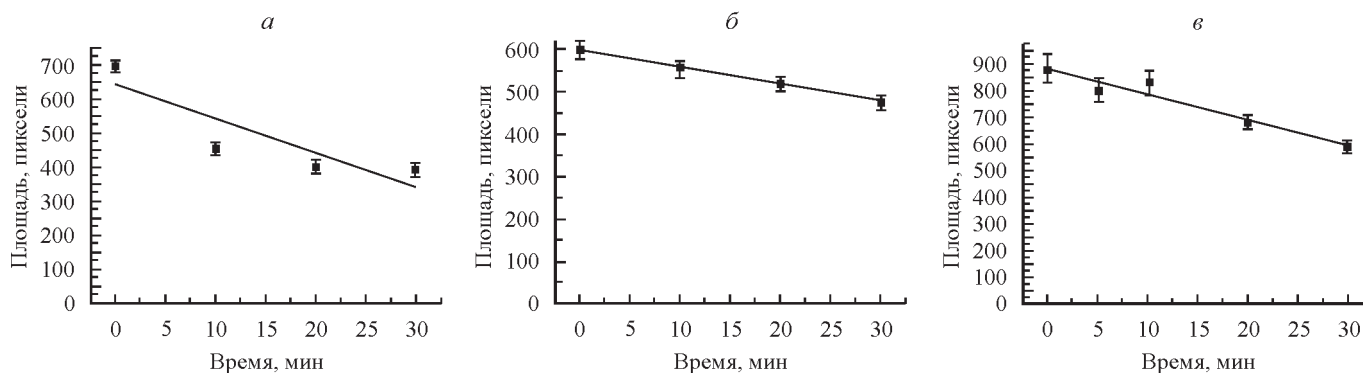


Рис. 2. Начальные изменения площади клеток при действии NAC (а), ALA (б) и латрункулина В, деполимеризатора актиновых филаментов (в).

На всех графиках: точки соответствуют экспериментальным значениям начальных участков (0—30 мин) тех же зависимостей, что и на рис. 1, прямые линии — линейные зависимости, описывающие экспериментальные точки (согласно уравнению линейной зависимости  $y = ax + b$ ). Углы наклона прямых (эквивалент коэффициента  $a$  в уравнении линейной зависимости) составляют  $-10.0$  и  $-4.11$  для NAC и ALA соответственно. Разница значений между временными точками «0» и «30» достоверна при  $P < 0.05$  (по  $t$ -критерию Стьюдента).

чем быстрее и активнее реагирует клетка на воздействие. Мы анализируем только начальные события и пытаемся найти корреляцию между морфометрическими показателями сразу после действия агента и дальнейшим изменением функциональной активности клетки. Морфометрические изменения, происходящие на протяжении долгого времени и с участием смены среды клеток (20—48 ч), мы не анализируем, поскольку они безусловно имеют более сложную зависимость.

Изменение площади клеток при действии других агентов. Сигнальная цепь, связывающая изменение формы клетки и ее поведение, обязательно включает в себя реорганизацию структур цитоскелета (Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012; Nao et al., 2014). Нами показано, что и NAC, и ALA реорганизуют актиновые филаменты в клетке (Ефремова и др., 2004; Gamaley et al., 2006; Вахромова и др., 2009). Поэтому мы прежде всего оценили изменение параметра А при деполимеризации актинового цитоскелета в клетке латрункулином В. Какие-либо мишени его действия в клетке, кроме актиновых структур, по данным из литературы неизвестны (Spector et al., 1983, 1989; Yarmola et al., 2000; El Sayed et al., 2006). Однако чувствительность клеток, обработанных латрункулином, к действию ЕКК уменьшается (см.

таблицу), причем дозозависимо. После удаления агента (замены среды) чувствительность постепенно возвращается к контрольному уровню. Кривую изменения параметра А при действии латрункулина (500 нМ) тоже можно описать прямой линией в течение первых 30 мин (рис. 2, в). На рисунке видно, что у нее довольно крутой наклон с углом  $-9.5^\circ$  (в разных экспериментах этот угол меняется в пределах  $9.0$ — $14.9^\circ$ ). По величине этого угла можно полагать, что латрункулин вызывает изменения параметра А, сравнимые с изменениями при действии антиоксидантов.

Далее мы испытали влияние на чувствительность клеток 3Т3-SV40 к лизису ЕКК и на параметр А агентов, изменяющих уровень глутатиона и, следовательно, АФК в клетках. Это OTZ и BSO. OTZ содержит тиоловую группу и, подобно NAC, увеличивает уровень глутатиона за счет образования L-цистеина; BSO, наоборот, понижает внутриклеточный пул глутатиона, так как является специфическим ингибитором  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы (Griffith, Meister, 1979; Meister, Anderson, 1983). OTZ (5 мМ), подобно NAC, понижает, а BSO (1 мкМ), подобно ALA, повышает уровень активных форм кислорода в клетке (Гамалей и др., 2003; Люблинская и др., 2013). Оказалось, что эти агенты не влияют на чувствительность

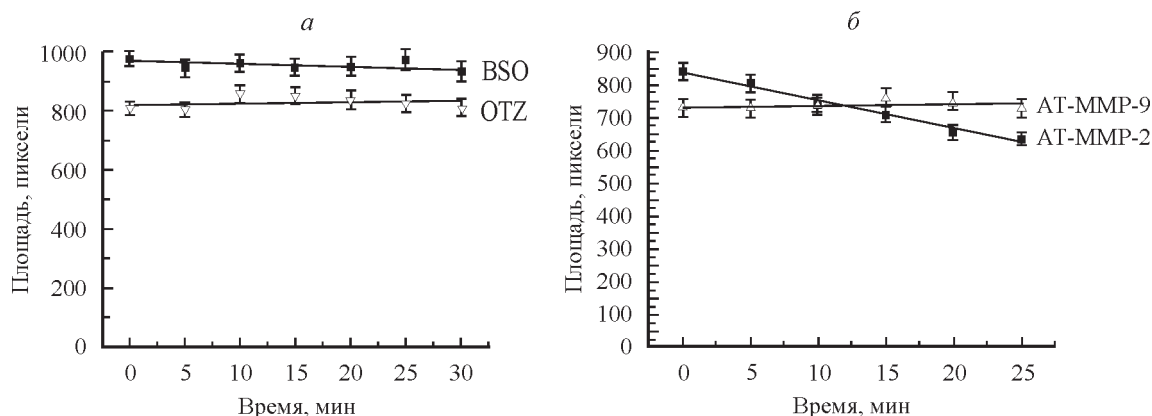


Рис. 3. Зависимости площади клеток 3Т3-SV40 при действии агентов, не влияющих на чувствительность клеток к литической активности естественных киллерных клеток.

а — 1 мкМ BSO и 5 мМ OTZ; б — антитела к металлопротеазам MMP-2 (AT-MMP-2) и MMP-9 (AT-MMP-9). Точки соответствуют экспериментальным значениям, прямые линии — теоретическим. Углы наклона кривых составляют:  $-1.07$ ,  $0.5$ ,  $1.05$  и  $-9.35$  для BSO, OTZ, MMP-9 и MMP-2 соответственно. Разница значений между временными точками «0» и «25» достоверна при  $P < 0.05$  только для AT-MMP-2.



клеток к литической активности ЕКК (см. таблицу) ни во время прямого действия, ни после удаления их из культуральной среды. Как оказалось, в их присутствии почти не изменяется и параметр А (рис. 3, а). Их временные зависимости выглядят прямыми линиями с углами наклона  $-1.07^\circ$  для BSO и  $0.5^\circ$  для OTZ (изменения статистически незначимы и повторяются в разных экспериментах).

На следующем этапе мы испытывали влияние на эти те же параметры двух агентов, относящихся к одному и тому же классу гликопротеинов и избирательно связывающихся только с определенными молекулами. Это антитела к MMP-2 и MMP-9 — протеиназам, которые секретируются клеткой и находятся во внеклеточной среде. Ранее мы использовали эти антитела, чтобы понять вклад MMP в перестройку ВКМ и изменение чувствительности клеток 3T3-SV40 к литической активности ЕКК. Введение в ростовую среду антител к MMP-9 не изменяет, а введение антител к MMP-2 уменьшает чувствительность клеток к действию ЕКК более чем в 2 раза (см. таблицу). Морфометрические измерения показали, что в присутствии антител к MMP-9 изменения площади клеток нет (рис. 3, б). Незначительные изменения, причем с положительным знаком, видимые на рисунке, статистически незначимы. Что касается антител к MMP-2, то они привели к резкому сокращению площади клетки, а угол наклона прямой составил  $-9.35^\circ$ . Трудно предполагать, что сами по себе антитела могут оказывать на клетку плейотропное действие, подобное антиоксидантам и другим биологически активным соединениям.

Таким образом, полученный результат показывает, что изменение морфологического показателя коррелирует с изменением функциональной активности клеток 3T3-SV40 — чувствительностью к ЕКК. Для взаимодействия киллерной клетки с клеткой-мишенью принципиальное значение имеет структура поверхности клетки-мишени. Ее изменения могут приводить, в частности, к перераспределению рецепторов и к увеличению доступности одних и уменьшению доступности других. Кроме того, изменение степени распластанности, связанное с интегринавыми рецепторами, изменяет активность многих сигнальных путей клетки. Предполагается, что переключение физических сигналов на химические внутри клетки происходит с помощью двух белков (YAP и TAZ), хотя в целом механизм остается неясным (Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012; Hao et al., 2013).

Известно, что NAC и ALA действуют на разные мишени в клетке, которые могут опосредовать изменение ее активности (Parasassi et al., 2010; Packer, Cadenas, 2011) и которые мы здесь не обсуждаем. Нас интересовал лишь вклад в ответ клетки морфологических изменений поверхности. Полученные результаты не претендуют на исчерпывающее объяснение механизмов влияния антиоксиданта на чувствительность клетки к литической активности ЕКК, но показывают, что геометрия поверхности клетки может быть тонким функциональным индикатором ее реакции на действие антиоксиданта. Из всех испытанных агентов особое положение занимает NAC: ответ клетки (чувствительность к лизису ЕКК) на его действие довольно сложен и опосредован его удалением из среды. При этом NAC перестраивает цитоскелет и меняет форму клетки довольно быстро, но этих изменений еще недостаточно, для того чтобы изменить взаимодействие с ЕКК, но достаточно, чтобы изменить взаимодействие с бактериями (Gamaley et al., 2006; Vozhokina et al., 2013, 2014). Полученные результаты говорят еще и том, что для из-

менения ответа клетки важны не просто изменения геометрии поверхности, но и ее конкретные детали (механизмы), от которых зависят те или иные функциональные изменения. Возникшее в клеточной биологии сравнительно недавно новое направление, изучающее связь формы клетки с ее поведением, интересно и перспективно, особенно в отношении стволовых клеток (Hao et al., 2014).

Авторы выражают глубокую благодарность Ю. А. Негуляеву (Институт цитологии РАН) за техническую помощь в работе с микроскопом AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), оборудованным устройствами для долговременного прижизненного наблюдения за клетками.

### Список литературы

- Вахромова Е. А., Полозов Ю. С., Кирпичникова К. М., Аксенов Н. Д., Гамалей И. А. 2009. Действие альфа-липоевой кислоты на фибробласты 3T3 и 3T3-SV40. Сравнение с действием N-ацетилцистеина. Цитология. 51(12): 971—977. (Vakhromova E. A., Polozov Yu. S., Kirpichnikova K. M., Aksenov N. D., Gamaley I. A. 2010. Effect of alpha-lipoic acid on 3T3 and 3T3-SV40 fibroblasts: comparison with N-acetylcysteine Cell Tissue Biol. 4 (2): 185—191.)
- Воронкина И. В., Вахромова Е. А., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А. 2014. Анализ изменения активности матриксных металлопротеаз трансформированных фибробластов при действии N-ацетилцистеина. Цитология. 56 (10): 717—724. (I. V. Voronkina, E. A. Vakhromova, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, I. A. Gamaley. 2015. Matrix metalloproteinase activity in transformed cells exposed to an antioxidant. Cell Tissue Biol. 9 (1): 16—23.)
- Гамалей И. А., Аксенов Н. Д., Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М. 2003. Влияние агентов, изменяющих внутриклеточный уровень активных форм кислорода, на характер распределения клеток линий 3T3 и 3T3SV40 по фазам клеточного цикла. Цитология. 45 (1): 26—33. (Gamaley I. A., Aksenov N. D., Efremova T. N., Kirpichnikova K. M. 2003. Effect of agents changing the intracellular level of reactive oxygen species on the cell cycle phase distribution in 3T3 and 3T3SV40 cell lines. Tsitologiya. 45 (1): 26—33.)
- 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. 4 (6): 580—586.)
- Ефремова Т. Н., Кирпичникова К. М., Хайтлина С. Ю., Гамалей И. А. 2004. Перестройки актинового цитоскелета в клетках 3T3 и 3T4-SV40 в присутствии антиоксидантов. Цитология. 46 (5): 395—403. (Efremova T. N., Kirpichnikova K. M., Khaytina S. Y., Gamaley I. A. 2004. Antioxidants-induced rearrangements of actin cytoskeleton in 3T3 and 3T3-SV40 fibroblasts. Tsitologiya. 46 (5): 395—403.)
- Люблинская О. Г., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2013. Сравнительное влияние антиоксидантов на уровень активных форм кислорода в нормальных и трансформированных фибробластах. Цитология. 55 (10): 732—736. (Lyublinkskaya O. G., Kirpichnikova K. M., Gamaley I. A. 2014. Antioxidant action on the level of reactive oxygen species in normal and transformed fibroblasts. Cell Tissue Biol. 8 (1): 33—37.)
- Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Вахромова Е. А., Гамалей И. А. 2009. Влияние  $\alpha$ -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., Vakhromova 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.)

Филатова Н. А., Кирпичникова К. М., Гамалей И. А. 2008. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках 3Т3-SV40 и их чувствительность к литической активности естественных киллерных клеток. Цитология. 50 (3) : 261—267. (Filatova N. A., Kirpichnikova K. M., Gamaley I. A. 2008. Reorganization of actin cytoskeleton in 3T3-SV40 cells and their sensitivity to lysis by natural killer cells. Cell Tissue Biol. 2 (2) : 146—152.)

Филатова Н. А., Тюряева И. И., Иванов В. А. 2008. Распознавание и лизис естественными киллерами опухолевых клеток при участии ламинина. Цитология. 50 (1) : 72—78. (Filatova N. A., Tyuryaeva I. I., Ivanov V. A. 2008. Recognition and lysis by natural killers of tumor cells with participation of laminin. Tsitologiya. 50 (1) : 72—78.)

Цаплина О. А. 2013. Фагоцитоз патогенных бактерий: модификация клеточных процессов бактериальными эффекторами. Цитология. 55 (2) : 83—91. (Tsaplina O. A. 2013. Phagocytosis of bacterial pathogens: modification of cellular processes by bacterial factors. Tsitologiya. 55 (2) : 83—91.)

Bozhokina E., Khaïlina S., Gamaley I. 2014. Dihydro-lipoic but not alpha-lipoic acid affects susceptibility of eukaryotic cells to bacterial invasion. Biochem. Biophys. Res. Commun. In press.

Bozhokina E., Vakhromova E., Gamaley I., Khaïlina S. 2013. N-acetylcysteine increases susceptibility of HeLa cells to bacterial invasion. J. Cell. Biochem. 114 : 1568—1574. doi: 10.1002/jcb.24498.

Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Corde-nonsi M., Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., Piccolo S. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. Nature. 474 : 179—83. doi: 10.1038/nature10137.

El Sayed K. A., Youssef D. T., Marchetti D. 2006. Bioactive natural and semisynthetic latrunculins. J. Nat. Prod. 69 : 219—223.

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

Griffith O. W., Meister A. 1979. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 11 : 5606—5610.

Halder G., Dupont S., Piccolo S. 2012. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13 : 591—600.

Hao J., Zhang Y., Wang Y., Ye R., Qiu J., Zhao Z., Li J. 2014. Role of extracellular matrix and YAP/TAZ in cell fate determination. Cell Signal. 26 : 186—191.

Hashimoto Y., Sudo H. 1971. Evaluation of cell damage in immune reactions by release of radioactivity from <sup>3</sup>H-uridine labeled cells. Gann. 62 : 139—145.

Long E. O., Rajagopalan S. 2002. Stress signals activate natural killer cells. J. Exp. Med. 196 : 1399—1402.

Meister A., Anderson M. E. 1983. Glutathione. Annu Rev Biochem. 52 : 711—760.

Moretta L., Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. EMBO J. 23 : 255—259.

Packer L., Cadenas E. 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. J. Clin. Biochem. Nutr. 48 : 26—32.

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.

Spector I., Shochet N. R., Blasberger D., Kashman Y. 1989. Latrunculins — novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. Cell Motil. Cytoskeleton. 13 : 127—144.

Spector I., Shochet N. R., Kashman Y., Groweiss A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. Science. 219 : 493—495.

Takeda K., Okumura K. 2004. CAM and NK cells. eCAM. 1 : 17—27.

Yarmola E. G., Somasundaram T., Boring T. A., Spector I., Bubb M. R. 2000. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. J. Biol. Chem. 275 : 28 120—28 127.

Поступила 25 V 2015

## CELLS FORM AND THEIR SENSITIVITY TO LYTIC ACTIVITY OF NATURAL KILLER CELLS UNDER THE ANTIOXIDANT ACTION

K. M. Kirpichnikova, Yu. P. Petrov, N. A. Filatova, I. A. Gamaley<sup>1</sup>

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

<sup>1</sup> e-mail: igamaley@mail.cytspb.rssi.ru

The present paper is an attempt to estimate the influence of cell surface morphology changes to functional activity under the effect of antioxidant, N-acetylcysteine (NAC), and alpha-lipoic acid (ALA). Two experimental parameters were used to characterize transformed fibroblasts 3T3-SV40 status. The functional one was the cell sensitivity to lysis by natural killer (NK) mouse splenocytes, and morphology index (cell form index) was a cell area. We showed that addition of NAC or ALA to the cell medium caused fast decrease of cell area and changes of cell form. On the other hand, their sensitivity to lysis NK cells gradually and significantly decreased. Then we compared NAC or ALA effect with the effects of other substances, which were non-antioxidants but caused cell responses which concurred with of antioxidants, at least partly. They were: latrunculin B, desorganizing actin filaments (as both antioxidants), OTZ reducing ROS level in the cell (as NAC), BSO (inhibitor of glutathione synthesis), increasing ROS level in the cell (as ALA), antibodies to gelatinases, MMP-2 and MMP-9 inactivating their activities (as both antioxidants). The results obtained showed a correlation between changes of morphology index and functional activity, sensitivity to lysis by NK cells. We suppose that geometry of cell surface might be a functional indicator of cell reaction to the antioxidant.

Key words: 3T3-SV40 cells, surface morphology, natural killer cells, antioxidants NAC and ALA, latrunculin B, OTZ, BSO, antibodies to MMP-2 and MMP-9.