УДК 576.385.5

РАЗЛИЧНАЯ РЕАКЦИЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА ДЕЙСТВИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОРМОНОВ

© 2020 г. Е. П. Турищева^{1, *}, М. С. Вильданова¹, Д. М. Поташникова¹, Е. А. Смирнова¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра клеточной биологии и гистологии,

Москва, 119991 Россия *E-mail: kitten-caterina@yandex.ru Поступила в редакцию 22.04.2020 г. После доработки 03.05.2020 г. Принята к публикации 03.05.2020 г.

Растительные гормоны – это сигнальные молекулы, регулирующие рост и развитие растений. Многие растительные гормоны находят применение в медицине, в связи с чем исследование влияния менее изученных растительных гормонов на клетки человека представляет научный интерес. Целью данной работы являлось исследование влияния растительных гормонов абсцизовой кислоты (АБК) и гиббереллиновой кислоты (ГК) в концентрации 2 мМ на биосинтетическую систему (эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи и везикулы кислого компартмента) культивируемых дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080 человека. Используя методы световой и электронной микроскопии, мы показали, что компоненты биосинтетической системы этих клеточных линий по-разному реагировали на АБК и ГК. В частности, расширение цистерн ЭПР в дермальных фибробластах наблюдали при действии ГК, а в клетках фибросаркомы – при действии АБК. Перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра происходило в дермальных фибробластах при действии АБК и ГК, но не наблюдалось в клетках фибросаркомы. Однако при действии АБК в клетках фибросаркомы наблюдали расширение цистерн аппарата Гольджи. Состояние везикул кислого компартмента в дермальных фибробластах на ультраструктурном уровне изменялось только при действии АБК, что выражалось в появлении множества везикул со слоистым содержимым. В клетках фибросаркомы изменение состояния везикул кислого компартмента, выявляемое с помощью окрашивания лизотрекером, наблюдали при действии АБК и ГК. Следовательно, реакция биосинтетической системы клеток соединительнотканного происхождения на действие растительных гормонов АБК и ГК различается в нормальных и опухолевых клетках, а также отличается от описанной ранее для клеток эпидермоидного происхождения.

Ключевые слова: абсцизовая кислота, гиббереллиновая кислота, биосинтетическая система, фибробласты **DOI:** 10.31857/S0041377120080088

Растительные гормоны, или фитогормоны — это сигнальные молекулы различной химической природы, регулирующие рост и дифференцировку растений.

Исследования показали, что фитогормоны могут оказывать разностороннее влияние на жизнеспособность и метаболизм клеток человека, в частности, участвовать в регуляции поглощения глюкозы, протекании воспаления, в прохождении клеток по клеточному циклу (Lin, Tan, 2011; Chanclud, Lacombe, 2017), а также оказывать влияние на секреторную активность клеток. Так, абсцизовая кислота (АБК) стимулирует секрецию инсулина из β -клеток островков Лангерганса и секрецию гормона желудочно-кишечного тракта GLP-1 (glucagon-like peptid 1) из энтероэндокринных L-клеток линии hNCI-H716 (Bruzzone et al., 2008, 2015), а гиббереллиновая кислота (ГК) вызывает повышение содержания α -амилазы в мезенхимных стромальных клетках, выделенных из жирового тела Биша человека (Kasamatsu et al., 2012).

Изменение секреторной активности клеток может быть вызвано воздействием АБК и ГК на их биосинтетические и секреторные процессы. Ранее нами было показано, что АБК и ГК оказывают определенное влияние на биосинтетическую (секреторно-синтетическую) систему культивируемых нормальных и опухолевых кератиноцитов человека (Вильданова и др., 2014).

Принятые сокращения: АБК – абсцизовая кислота; ГК – гиббереллиновая кислота; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; DAPI – (4',6-diamidino-2-phenylindole); МТТ – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; РІ – йодид пропидия; UPR – ответ на несвернутые белки (unfolded protein response).

В связи с этим возникает вопрос, является ли реакция на эти растительные гормоны специфической для клеток эпидермоидного происхождения, которые, как известно, могут синтезировать АБК в ответ на действие определенных факторов, и на нее же реагировать (Bruzzone et al., 2012). Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния растительных гормонов АБК и ГК на секреторно-синтетическую систему культивируемых нормальных и опухолевых клеток человека соединительнотканного происхождения, а именно, дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. Использовали дермальные фибробласты человека (0-16 пассаж). предоставленные В.Ю. Сысоевой (факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова) и клетки линии НТ1080 (фибросаркомы человека), предоставленные И.И. Киреевым (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова). Клетки выращивали в стандартных условиях (37°С, 5% СО₂) в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки теленка (FBS), 2 мМ L-глутамина, антибиотик гентамицин в конечной концентрации 60 мкг/мл и антимикотик амфотерицин В в конечной концентрации 1 мкг/мл. Клетки пассировали смесью растворов трипсина и Версена (0.2% раствор ЭДТА в фосфатном буфере) в соотношении 3 : 7. При проведении экспериментов клетки высаживали в 96-луночные платы в концентрации 40000 (дермальные фибробласты) и 60000 (НТ1080) кл./мл или в чашки Петри с покровными стеклами в концентрации 20000 (дермальные фибробласты) и 35000 (НТ1080) кл./мл и культивировали в течение 24 ч. Стоковые спиртовые растворы АБК (189 мМ) и ГК (500 мМ) добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 2 мМ. Время культивирования с растительными гормонами составляло 24 ч.

Оценка жизнеспособности с помошью МТТ-теста. Клетки высаживали в 96-луночную плату (по 90 мкл среды с клетками, то есть по 3600 фибробластов и по 5400 клеток фибросаркомы в каждую лунку). Через 24 ч культивирования в контрольные лунки добавляли по 10 мкл культуральной среды, в остальные лунки – по 10 мкл 20 мМ раствора АБК или ГК, приготовленных на культуральной среде из стокового спиртового раствора, или 10.2%-ного раствора этилового спирта (контроль со спиртом как с растворителем). приготовленного на культуральной среде из 96%-ного спирта, и культивировали 24 ч. Затем в каждую лунку добавляли по 20 мкл реактива МТТ (thiazolyl blue tetrazolium bromide, 98%), разведенного культуральной средой до концентрации 1.5 мг/мл (конечная концентрация составляла 0.25 мг/мл), и культивировали 1 ч при 37°С. Затем из каждой лунки отбирали среду и добавляли по 60 мкл ДМСО на

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 8 2020

15 мин для растворения гранул образовавшегося формазана. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия) при длине волны 530 нм. По результатам МТТ-теста в трех независимых экспериментах для каждого воздействия получали выборку (n = 6).

Проточная цитофлуориметрия. Для анализа клеточного шикла клетки снимали с поверхности пластикового сосуда смесью растворов трипсина и Версена, отмывали от среды культивирования фосфатно-солевом буферным раствором PBS, дважды центрифугируя клеточную суспензию в течение 3 мин при 3000 об./мин, и фиксировали ледяным 70%-ным этанолом в течение ночи при 4°C. Затем образцы отмывали от фиксатора PBS, дважды центрифугируя клеточную суспензию в течение 5 мин при 3000 об./мин. и окрашивали раствором йолила пропидия (PI) на PBS (в конечной концентрации PI 30 мкг/мл), содержащем РНКазу А (в конечной концентрации 10 мкг/мл) в течение ночи в темноте при комнатной температуре. Далее образцы отмывали от красителя PBS, дважды центрифугируя клеточную суспензию в течение 5 мин при 3000 об./мин. и анализировали на проточном сортере FACSAria (Beckton Dickinson, CIIIA).

Цитохимическое окрашивание. Для прижизненного выявления ЭПР использовали краситель ER-Tracker Red. Концентрация стокового раствора, разведенного в ДМСО, составляла 1 мМ. Для прижизненного выявления везикул кислого компартмента использовали краситель LysoTracker Red DND-99. Концентрация стокового раствора, разведенного в ДМСО, составляла 1 мг/мл. Краситель добавляли в среду культивирования в чашки Петри, в которых находились стекла с клетками, на 30 мин при 37°С из расчета 1 мкл на 1 мл среды. Препараты, окрашенные ER-Tracker Red, отмывали средой 5 мин при 37°С и помещали в камеру для прижизненных наблюдений.

Препараты, окрашенные LysoTracker Red DND-99, отмывали средой без сыворотки (2 смены по 5 мин) и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в PBS в течение 15 мин с последующим заключением в смесь мовиола с DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в соотношении 30:1. Съемку препаратов проводили с одинаковой выдержкой: 500 мс для дермальных фибробластов и 600 мс для клеток фибросаркомы.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки фиксировали на покровных стеклах 4%-ным раствором параформальдегида, разведенном в PBS, в течение 15 мин, затем препараты трижды промывали PBS по 5 мин. Для пермеабилизации клеточных мембран препараты помещали в 0.5%-ный раствор детергента Triton X100 на 10 мин, затем трижды промывали PBS по 5 мин. Далее для выявления аппарата Гольджи препараты инкубировали с первичными мышиными моноклональными антителами к белку аппарата Гольджи GM130 (Golgi matrix protein 130), разведенными в PBS, в течение 30 мин во влажной камере при температуре 37°С. Клетки отмывали от первичных антител 0.1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) на PBS три раза по 5 мин и помещали в раствор вторичных моноклональных антител козы к IgG мыши, конъюгированных с Alexa Fluor 488, в аналогичных условиях. Вторичные антитела разводили на 0.1% BSA. Затем препараты три раза по 5 мин промывали 0.1%-ным BSA и заключали в смесь мовиола с DAPI.

Световая микроскопия. Препараты анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия) (объектив PlanApo 63×/1.4 oil), снабженного черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam и программным обеспечением AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Inc., Германия), а также с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP2 (Leica, Германия).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Клетки промывали средой без сыворотки и фиксировали на стеклах 2.5%-ным глутаровым альдегидом с добавлением 2% формалина на 0.1 М PBS в течение 1 ч. Затем клетки промывали PBS в течение 15 мин и проводили дофиксацию в 1%-ном OsO₄ 1 ч в темноте. Обезвоживание и заключение в Эпон 812 проводили по стандартной методике. Ультратонкие срезы залитых в Эпон образцов контрастировали 1.5%-ным раствором уранилацетата в течение 15 мин и цитратом свинца по Рейнольдсу 15 мин. Срезы исследовали с помошью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония) (ускоряющее напряжение 80-100 кВ) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN.

Обработка и анализ результатов. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). Для статистической обработки данных использовали U-критерий Манна—Уитни (непараметрический). Различие считали статистически достоверным, если уровень значимости P был ≤ 0.01 .

Использованные реактивы: абсцизовая кислота, гиббереллиновая кислота (Merck, США); среда DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium), L-глутамин, трипсин, Bepceн, MTT (Thiazolyl Blue tetrazoliит Bromide, 98%), ДМСО (ПанЭко, Россия); фетальная сыворотка теленка (FBS; PAA Laboratories, Австрия); гентамицин (Белмедпрепараты, Беларусь); амфотерицин B (Синтез, Россия); фосфатносолевой буфер PBS pH 7.4, DAPI (4',6-diamidino-2phenylindole) (Merck, США); йодид пропидия (PI; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Германия); 40%-ный формалин (MP Biomedicals, США); 25%ный глутаровый альдегид (Ted Pella Inc., США); четырехокись осмия (OsO₄) и Тритон X-100 (Serva, Германия); бычий сывороточный альбумин (МР Вiomedicals, Франция); мовиол (Hoechst, Германия); этиловый спирт, ацетон (Лаверна Стройинжиниринг, Россия); эпоновая смесь: Epon 812, DDSA (dodecenylsuccinic anhydride), MNA (nadic methyl anhydride) и катализатор полимеризации DMP-30 (Fluka Chemicals/Sigma-Aldrich, США); LysoTracker Red DND-99 и ER-Tracker Red (BODIPY[™] TR Glibenclamide) (Thermo Fisher Scientific, США); мышиные моноклональные антитела к белку цис-части аппарата Гольджи GM130 (Merck, США); моноклональные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Жизнеспособность дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080. Выбор концентрации растительных гормонов АБК и ГК (из лиапазона 100 мкМ-2 мМ) для воздействия на клетки проводили методом МТТ-теста; время воздействия составляло 24 ч. Диапазон концентраций гормонов и время были выбраны на основании более ранних исследований (Fingrut, Flescher, 2002; Вильданова и др., 2014). По результатам МТТ-теста, представленным на рис. 1. достоверных различий между контролем и контролем с 96%-ным этиловым спиртом, как растворителем растительных гормонов, обнаружено не было, поэтому для оценки результатов дальнейших экспериментов использовали только показатели контроля с этанолом. Согласно данным МТТ-теста, АБК в концентрации 2 мМ снижала жизнеспособность дермальных фибробластов на 15.8%, а клеток фибросаркомы НТ1080 – на 16.9%. В свою очередь, ГК в той же концентрации вызывала снижение жизнеспособности дермальных фибробластов на 21.3%, а клеток фибросаркомы - на 28.2%. То есть при одних и тех же значениях концентрации и времени воздействия ГК более значительно, чем АБК снижала жизнеспособность обеих клеточных линий.

Следует отметить, что при концентрации АБК и ГК 2 мМ большая часть популяции клеток обеих линий сохраняла жизнеспособность, однако доля жизнеспособных клеток незначительно, но достоверно снижалась. Учитывая эти, а также данные, ранее полученные на клетках эпидермоидного происхождения (Вильданова и др., 2014, 2019), концентрация 2 мМ была выбрана для последующих экспериментальных воздействий.

Структурное состояние ЭПР в дермальных фибробластах. Прижизненное выявление ЭПР с помощью ЭПР-трекера показало, что АБК и ГК не вызывают заметных изменений распределения и морфологии ЭПР в дермальных фибробластах. В контрольных клетках и при воздействии АБК и ГК ЭПР выявлялся как сеть из тонких трубочек разной длины и толщины, распространяющаяся от ядра к клеточной периферии (рис. 2a-в). Некоторые трубочки имели

568



Рис. 1. Жизнеспособность дермальных фибробластов (*белые столбцы*) и клеток HT1080 (*черные столбцы*) при действии абсцизовой (АБК) или гиббереллиновой (ГК) кислоты в концентрации 2 мМ. Данные MTT-теста. 1 – чистый контроль; 2 – контроль с 96%-ным этиловым спиртом; 3 – АБК; 4 – ГК. Показаны средние значения параллельных измерений (n = 3-6) и их стандартные от-клонения. Приведены данные одного из трех экспериментов, давших сходный результат. * достоверность различия с чистым контролем при $P \leq 0.01$ по критерию Манна–Уитни.

утолщения, напоминающие бусы на нитке. При исследовании состояния ЭПР с помощью ТЭМ было обнаружено, что по сравнению с контрольными клетками (рис. 2r) действие АБК не вызывало заметных изменений состояния цистерн ЭПР (рис. 2d), но при действии ГК расширение цистерн ЭПР носило выраженный характер (рис. 2e). Таким образом, морфологические изменения ЭПР наблюдали только при действии ГК и только на ультраструктурном уровне.

Структурное состояние аппарата Гольджи в дермальных фибробластах. Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи показало, что в популяции дермальных фибробластов вид и расположение аппарата Гольджи относительно ядра в разных клетках может быть различным. Аппарат Гольджи располагался с одной стороны ядра или с двух противоположных его сторон в виде шапочек, или же был распределен вокруг ядра. При этом аппарат Гольджи мог быть в компактном или растянутом состоянии. Для оценки изменений состояния аппарата Гольджи расположения этой органеллы относительно ядра условно разделили на полярное (аппарат Гольджи занимает не более половины окружности ядра), биполярное (аппарат Гольджи выявляется как два скопления на противоположных сторонах ядра) и неполярное (аппарат Гольджи занимает больше половины окружности ядра) (рис. 3а-в). Подсчет клеток с этими вариантами расположения аппарата Гольджи в популяции дермальных фибробластов показал, что в контроле 69% клеток имели полярный тип расположения, 8% – биполярный и 23% – неполярный. При этом культивирование дермальных фибробластов с растительными гормонами приво-

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 8 2020

дило к изменению соотношения вариантов расположения аппарата Гольджи в клеточной популяции (рис. 3*г*).

После воздействия АБК клеток с полярным типом расположения аппарата Гольджи становилось меньше на 13%, а клеток с неполярным типом – больше на 13%. После воздействия ГК клеток с полярным типом аппарата Гольджи становилось меньше на 8%, а клеток с неполярным типом – больше на 9%. Доля клеток с биполярным расположением аппарата Гольджи после воздействия АБК не изменялась, а после воздействия ГК уменьшалась на 1%. При этом на ультраструктурном уровне значительных изменений морфологии аппарата Гольджи после действия растительных гормонов обнаружено не было. Аппарат Гольджи на срезах в контрольных клетках и после действия АБК и ГК выявлялся в виде стопок цистерн, располагавшихся линейно или полукругом (рис. $3\partial - \mathcal{W}$).

Таким образом, культивирование дермальных фибробластов с АБК и ГК приводило к изменениям соотношения клеток с разным расположением аппарата Гольджи: доля клеток с полярным расположением аппарата Гольджи уменьшалась, а доля клеток с неполярным расположением аппарата Гольджи возрастала.

Вклад в разнообразие формы и положения аппарата Гольджи может вносить его динамика в клеточном цикле — в поздней фазе G_2 и ранней профазе лента аппарата Гольджи разбирается на отдельные стопки (Huang, Wang, 2017; Wei, Seemann, 2017). Задержка в той или иной фазе клеточного цикла может приводить к изменению соотношения клеток с разным расположением аппарата Гольджи в клеточной популяции. В связи с этим было проведено исследование распределения популяции дермальных фибробластов по фазам клеточного цикла после культивирования с растительными гормонами методом проточной цитофлуориметрии.

Распределение дермальных фибробластов по фазам клеточного цикла. В контрольных образцах доля клеток, находящихся в фазах G₀/G₁, составляла 70.2% от общего числа проанализированных живых клеток, в фазе S – 6.8%, в фазах G₂/M – 17.4% (рис. 4*a*). После воздействия растительных гормонов распределение клеточной популяции по фазам клеточного цикла практически не изменялось. После культивирования с АБК в фазах G_0/G_1 находилось 67.9% клеток, в S-фазе – 8%, в G₂/М – 18% (рис. 4б). После культивирования с ГК в фазах G_0/G_1 находилось 66.6% клеток, в S-фазе – 9.6%, в G₂/M – 17.7% (рис. 4в). То есть накопления клеток в фазах G₀/G₁ и в G₂/М после воздействия АБК и ГК не происходило. Это указывает на то, что перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра после воздействия растительных гормонов не связано с задержкой в той или иной фазе клеточного цикла, а может быть вызвано непо-



Рис. 2. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) в дермальных фибробластах. *а*–*в* – Прижизненное выявление с помощью ЭПР-трекера (ER-Tracker Red); *г*–*е* – ультраструктура гранулярного ЭПР. *а*, *г* – Контроль; *б*, *д* – АБК; *в*, *е* – ГК. *Стрелки* указывают на цистерны ЭПР. *Масштабный отрезок*: 10 (*а*–*в*) или 1 (*г*–*е*) мкм, увел. об.: 63× (*а*–*в*).

средственно влиянием растительных гормонов на структурную целостность аппарата Гольджи.

Так как везикулы кислого компартмента входят в состав секреторно-синтетической системы клеток, далее мы проанализировали эти органеллы с помощью световой и электронной микроскопии.

Структурное состояние везикулярного компартмента в дермальных фибробластах. Везикулы кислого компартмента выявляли с помощью прижизненного окрашивания лизотрекером красным. Для оценки изменения характера окрашивания съемку клеток проводили на уровне резкости ядра с одинаковой



Рис. 3. Аппарат Гольджи в дермальных фибробластах. a-e - Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи (зеленый; ядра окрашены в*синий*цвет DAPI) с помощью антител к белку GM130 и типы его расположения: полярное (*a*), биполярное (*б*), неполярное (*s*).*г*– Распределение клеток с разными вариантами расположения аппарата Гольджи в клеточной популяции: полярное (*белые столбцы*), биполярное (*черные столбцы*), неполярное (*серые столбцы*) в контроле (1) и при действии – АБК (2) или ГК (3); показаны средние значения (<math>n = 83-195, где n - число проанализированных клеток) и их стандартные отклонения; * достоверность различия с контролем при $P \le 0.01$ по критерию Манна–Уитни. d-ж – Ультраструктура аппарата Гольджи в контроле (*д*) и после действия АБК (*e*) и ГК (*ж*); *стрелки* указывают на аппарат Гольджи. *Масштабный отрегок* – 10 (a-e) или 1 (d-w) мкм, увел. об.: $63 \times (a-e)$.

выдержкой. В дермальных фибробластах в контрольных образцах везикулы кислого компартмента локализовались преимущественно в околоядерной зоне: в этой части цитоплазмы наблюдали наибольшую яркость окрашивания лизотрекером, которая постепенно снижалась к периферии клеток. Культивирование с АБК и ГК не приводило к изменению характера окрашивания и распределения везикул в цитоплазме (рис. 5a-e). Тем не менее, при ультраструктурном анализе клеток (рис. 5e-e) мы обнаружили, что после воздействия АБК в цитоплазме присутствовало большое количество везикулярных структур, гетерогенных по форме, размеру и содержимому, занимавших обширную зону цитоплазмы и располагавшихся близко друг к другу (рис. 5d). Как показал детальный ультраструктурный анализ, внут-



Рис. 4. Гистограмма содержания ДНК в популяции дермальных фибробластов в контроле (*a*) и после воздействия растительных гормонов АБК (δ) и ГК (*в*). Р3, Р4, Р5 — Клетки в фазах клеточного цикла G₀/G₁, S, G₂/M соответственно. Проточная цитофлуориметрия.

ри многих везикул находились скрученные в виде концентрических колец мембранные структуры, причем количество таких мембранных кластеров могло быть от 1 до 3. После воздействия ГК заметных ультраструктурных изменений по сравнению с контрольными клетками мы не наблюдали (рис. 5е).

Таким образом, в дермальных фибробластах при действии АБК наблюдали изменение расположения

2020



Рис. 5. Везикулярный компартмент в дермальных фибробластах в контроле (a, e) и после действия АБК (b, d) или ГК (e, e). a - e - Uитохимическое окрашивание клеток лизотрекером красным (LysoTracker Red); выдержка 500 мс. e - e - Ультраструктура везикул; *стрелки* указывают на везикулы с неоднородным и слоистым содержимым. *Масштабный отрезок* – 10 (a-e) или 1 (e-e) мкм, увел. об.: $63 \times (a-e)$.

аппарата Гольджи относительно ядра и появление в цитоплазме множества гетерогенных по форме и размеру везикул со слоистым содержимым. При действии ГК происходило набухание цистерн ЭПР и изменение расположения аппарата Гольджи.

Структурное состояние ЭПР в клетках фибросаркомы HT1080. Прижизненное выявление ЭПР с помощью ЭПР-трекера показало, что АБК и ГК не вызывали заметных изменений распределения и морфологии ЭПР. В контрольных клетках и после воздействия растительных гормонов ЭПР представлял собой скопления трубочек и нитей, расположенных компактно и полярно относительно ядра (рис. 6a-e). При исследовании состояния ЭПР с помощью ТЭМ (рис. 6e-e) было обнаружено, что АБК вызывала расширение цистерн ЭПР (рис. 6d). При действии ГК изменения ультраструктуры ЭПР выявлены не были (рис. 6e).



Рис. 6. ЭПР в клетках фибросаркомы HT1080. a-e – Прижизненное выявление с помощью ЭПР-трекера (ER-Tracker Red). *г*-*е* – Ультраструктура гранулярного ЭПР. *a*, *г* – Контроль; *б*, *д* – АБК; *в*, *е* – ГК; *стрелки* указывают на цистерны ЭПР. *Mac-штабный отрезок*: 10 (*a*-*e*) или 1 (*г*-*e*) мкм, увел. об.: 63× (*a*-*e*).

Таким образом, морфологические изменения ЭПР в клетках фибросаркомы НТ1080 наблюдались на ультраструктурном уровне только при действии АБК.

Структурное состояние аппарата Гольджи в клетках фибросаркомы. Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи показало, что в популяции клеток фибросаркомы вид и расположение аппарата Гольджи относительно ядра различались, в связи с этим для дальнейшего анализа в популяции было выделено два варианта расположения аппарата Гольджи: полярное (аппарат Гольджи занимает не более половины окружности ядра) и неполярное (аппарат Гольджи занимает больше половины окружности ядра) (рис. 7a, δ). Доля клеток с полярным расположением аппарата Гольджи составляла 85.5%, а доля клеток с неполярным расположением — 14.5%. Воздействие растительных гормонов не приводило к изменениям в соотношении клеток с поляр-



Рис. 7. Аппарат Гольджи в клетках фибросаркомы HT1080. *а*, δ – Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи (*зеленый*; ядра окрашены в *синий* цвет DAPI) с помощью антител к белку GM130 и типы его расположения: полярное (*a*), неполярное (*б*). *в* – Распределение клеток с разными вариантами расположения аппарата Гольджи в клеточной популяции: полярное (*белые столбцы*), неполярное (*черные столбцы*) в контроле (*1*) и при действии – АБК (*2*) или ГК (*3*); показаны средние значения (*n* = 156–348, где *n* – число проанализированных клеток) и их стандартные отклонения; *достоверность различия с контролем при *P* ≤ 0.01 по критерию Манна–Уитни. *г*–*е* – Ультраструктура аппарата Гольджи в контроле (*г*) и после действия АБК (*d*) и ГК (*e*); *стрелки* указывают на аппарат Гольджи. *Масштабный отрезок* – 10 (*a*, *б*) или 1 (*г*–*е*) мкм, увел. об.: 63× (*a*, *б*).

ным и неполярным расположением аппарата Гольджи (рис. 7*в*). Однако исследование аппарата Гольджи на ультраструктурном уровне показало (рис. 7*е*–*е*), что после действия АБК цистерны аппарата Гольджи были расширены. В то же время, ГК не вызывала изменений морфологии аппарата Гольджи.

Таким образом, морфологические изменения аппарата Гольджи в клетках фибросаркомы на ультраструктурном уровне происходили только после воздействия АБК.

Структурное состояние везикулярного компартмента в клетках фибросаркомы. В клетках фибросаркомы НТ1080 везикулы кислого компартмента, выявляемые с помощью лизотрекера, были сконцентрированы в околоядерной зоне цитоплазмы (рис. 8*a*). После культивирования с АБК и ГК их расположение сохранялось, однако снижалась яркость окрашивания везикул (рис. 8*б*, *в*). Этот эффект хорошо заметен при компьютерной обработке изображений с использованием разных цветов для обозначения разной степени яркости пикселей изображения (рис. 8a-e). Ультраструктурный анализ не выявил изменений состояния везикулярных структур в клетках фибросаркомы (рис. 8e-e). Таким образом, в клетках фибросаркомы HT1080 при действии АБК происходит расширение цистерн ЭПР и аппарата Гольджи и изменяется характер окрашивания везикул кислого компартмента; при действии ГК изменяется только характер окрашивания везикул кислого компартмента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что секреторно-синтетическая система дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы HT1080 по-



Рис. 8. Везикулярный компартмент в клетках фибросаркомы HT1080 в контроле (*a*, *г*) и после действия AБК (*б*, *d*) или ГК (*e*, *e*). *a*-*e* – Цитохимическое окрашивание клеток лизотрекером красным (LysoTracker Red); выдержка 600 мс; *г*-*e* – ультраструктура везикул, *стрелки* указывают на везикулы с неоднородным и слоистым содержимым. *Масштабный отрезок*: 10 (*a*-*e*) или 1 (*г*-*e*) мкм, увел. об.: $63 \times (a-e)$.

разному реагировала на действие АБК и ГК. В частности, *в дермальных фибробластах* набухание цистерн ЭПР возникало при действии ГК, а *в клетках фибросаркомы* – при действии АБК. Расширение цистерн ЭПР может являться морфологическим проявлением стресса ЭПР или быть связано с повышением синтетической и (или) секреторной активности клеток. Так, ранее нами было показано, что

растительный гормон жасмоновая кислота индуцирует стресс ЭПР и вызывает расширение цистерн ЭПР в иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT (Вильданова и др., 2019).

Индукция стресса ЭПР растительными гормонами может быть связана с влиянием этих соединений на экспрессию одного или нескольких участников UPR (Unfolded Protein Response) – адаптивного от-

вета клеток на стресс ЭПР. Так, гиперэкспрессия участвующих в UPR транскрипционных факторов XBP1(S) (X-box binding protein 1 spliced) или ATF6a (activating transcription factor 6) приводит к расширению цистерн ЭПР в фибробластах NIH-3T3 и эмбриональных фибробластах мыши (MEF) (Sriburi et al., 2004; Bommiasamy et al., 2009). Этот эффект, как полагают авторы исследования, может быть связан с индукцией этими транскрипционными факторами синтеза фосфатидилхолина - основного фосфолипида мембраны ЭПР. Следует отметить, что молекулярные процессы, которые активируются в клетках животных при действии тех или иных растительных гормонов изучены недостаточно, но можно предположить, что ГК в дермальных фибробластах и АБК в клетках фибросаркомы оказывают влияние на экспрессию ХВР1 или на синтез фосфолипидов мембраны ЭПР.

Расширение цистерн ЭПР также может быть связано с ингибированием секреции продуктов синтеза из клеток. Так, моновалентный ионофор монензин ингибирует секрецию проколлагена и фибронектина в фибробластах кожи человека линии CRL 1220 (Ledger et al., 1980). В клетках, подвергшихся воздействию монензина, наблюдается сильно выраженное расширение цистерн ЭПР. Однако при действии монензина изменяется также ультраструктура аппарата Гольджи: в зоне, где в контрольных клетках располагается аппарат Гольджи. при воздействии монензина выявляются крупные везикулы, а типичные для данной органеллы стопки цистерн не обнаруживаются. При исследовании аппарата Гольджи дермальных фибробластов и клеток фибросаркомы после воздействия АБК и ГК нами не были обнаружены такие изменения аппарата Гольджи. В связи с этим можно предположить, что наблюдаемое нами расширение ЭПР при действии растительных гормонов не связано с ингибированием секреции и, возможно, указывает на стресс ЭПР.

При анализе состояния annapama Гольджи в дермальных фибробластах мы наблюдали клетки с разным расположением этой органеллы относительно ядра. Вклад в разнообразие формы и положения аппарата Гольджи может вносить его динамика в клеточном цикле (разборка на отдельные стопки в поздней G_2 -фазе/ранней профазе) (Huang, Wang, 2017; Wei, Seemann, 2017). В связи с этим мы предположили, что обнаруженное нами перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра после воздействия АБК и ГК может быть вызвано влиянием этих растительных гормонов на прохождение клеток по клеточному циклу. Однако согласно полученным нами данным проточной цитофлуориметрии, АБК и ГК не вызывали задержек в фазах клеточного цикла.

Следовательно, наблюдаемое перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра может свидетельствовать о частичной дезинтеграции аппарата Гольджи под воздействием растительных гормонов. В этом случае возможными мишенями АБК и ГК могут являться белки, участвующие в поддержании структурной целостности аппарата Гольджи, например, GRASP (Golgi reassembly and stacking proteins) и гольджины, такие как GM130 (Lowe, 2011). Необходимо отметить, что вызываемое АБК и ГК перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра не сопровождалось изменениями его ультраструктурного состояния. Отсутствие набухания цистерн аппарата Гольджи в сочетании с расширением цистерн ЭПР при действии ГК может свидетельствовать о стрессе ЭПР.

Напротив, в клетках фибросаркомы НТ1080 при действии АБК и ГК изменений распределения аппарата Гольджи относительно ядра не наблюдали. Это может свидетельствовать о том, что у растительных гормонов в нормальных и опухолевых клетках могут быть разные мишени. Более того, в отличие от дермальных фибробластов, в клетках фибросаркомы наблюдали расширение цистерн аппарата Гольджи после воздействия АБК. Необходимо отметить, что АБК вызывала также расширение цистерн ЭПР в этой клеточной линии. Этот эффект может быть связан с усилением синтетической и (или) секреторной активности клеток фибросаркомы при действии АБК или со стрессом ЭПР/аппарата Гольджи. Увеличение количества белков, поступающих в аппарат Гольджи из ЭПР, или поступление крупных карго – одна из причин стресса аппарата Гольджи (Machamer, 2015). Наблюдаемое нами расширение цистерн аппарата Гольджи в клетках фибросаркомы после действия АБК может отражать начальные этапы стресса этой органеллы, так как типичными морфологическими признаками стресса аппарата Гольджи являются разобщенные и значительно набухшие цистерны (Machamer, 2015).

Кроме того, расширение цистерн аппарата Гольджи может быть связано с тем, что АБК подавляет экспрессию белков, поддерживающих целостность аппарата Гольджи (GRASP65/55 и гольджинов Golgin45 и GM130). Показано, что двойной нокдаун GRASP65/55 или Golgin45/GM130 ведет к выраженному набуханию цистерн аппарата Гольджи в клетках HeLa, при этом разобщения цистерн в стопках аппарата Гольджи не происходит (Lee et al., 2014).

Содержимое аппарата Гольджи транспортируется в виде секреторных везикул и секреторных гранул к плазматической мембране и в виде транспортных везикул к органеллам эндосомно-лизосомного компартмента, к которым относятся ранние и поздние эндосомы, мультивезикулярные тельца, эндолизосомы, лизосомы и аутолизосомы (Paroutis et al., 2004). Для эндосомно-лизосомного компартмента, а также для секреторных гранул (везикул) характерен низкий показатель pH (Paroutis et al., 2004). Это позволяет выявить все эти везикулы с помощью прижизненного красителя лизотрекера (LysoTracker Red DND-99), который, согласно протоколу производи-

теля, накапливается в органеллах с кислым (пониженным) значением pH.

При анализе состояния везикул кислого компартмента дермальных фибробластов с помощью лизотрекера мы не обнаружили изменений размеров и локализации, а также характера окрашивания везикул. Это может свидетельствовать о сохранении нормального функционирования везикул кислого компартмента при действии АБК и ГК.

С помощью ультраструктурного анализа мы оценили состояние всего пула везикул, присутствующих в дермальных фибробластах. Интерес представляет большое количество везикул со скрученными мембранами внутри. обнаруженных при действии АБК. Эти везикулы (по крайней мере некоторые из них) могут представлять собой аутофагосомы (идентифицируемые по наличию двойной мембраны). Интересно, что при индукции стресса ЭПР туникамицином и тапсигаргином в клетках нейробластомы человека линии SK-N-SH (Ogata et al., 2006) часто наблюдали аутофагосомы, содержащие мультимембранные структуры (multi-lamellar structures), по морфологии сходные с наблюдаемыми нами в дермальных фибробластах. Несмотря на различия в модельных объектах, появление аналогичных везикул в дермальных фибробластах при действии АБК также может быть связано с индукцией стресса ЭПР напрямую или опосредованно.

Кроме того, сходные мультимембранные структуры при стрессе ЭПР были обнаружены и у дрожжей при обработке дитиотреитолом и туникамицином (Bernales et al., 2007; Schuck et al., 2014). При этом было показано, что мембраны, составляющие эти мультимембранные структуры, являются мембранами ЭПР, впоследствии деградирующими в вакуоли (лизосоме дрожжей) путем инвагинации ее мембраны (Schuck et al., 2014). Этот процесс был назван авторами исследования ЭПР-фагией (ER-phagy) (Schuck et al., 2014). Однако в этих работах авторы отмечали также значительную гипертрофию ЭПР, вызванную стрессом этой органеллы, в то время как в нашем исследовании при воздействии АБК на клетки в течение 24 ч гипертрофии ЭПР отмечено не было.

Считается, что аутофагосомы, образующиеся при ЭПР-фагии, селективно включают мембраны ЭПР, и двойная мембрана самой аутофагосомы отчасти образована мембраной ЭПР (Song et al., 2017). Скрученные мембраны, которые составляют везикулы, обнаруженные в нашем исследовании, сходны между собой, и промежутки между ними практически не отличаются. Кроме того, на этих мембранах встречаются рибосомы. Можно предположить, что данные везикулы являются примером ЭПР-фагии. Отсутствие же гипертрофии ЭПР на ультратонких срезах может быть связано с тем, что индукция стресса ЭПР могла произойти раньше, чем через 1 сут после введения АБК в среду культивирования, и наблюдаемая нами картина отражает процессы, связанные с восстановлением нормального объема ЭПР – так называемую аутофагию восстановления после стресса (ER-phagy-mediated-recovery from ER stresses; recovER-phagy) (Fregno, Molinari, 2018). Нормальный объем ЭПР мог уже восстановиться по истечении 1 сут, а деградация мембран ЭПР посредством ЭПРфагии еще не закончилась или же была нарушена.

В отличие от дермальных фибробластов, в клетках фибросаркомы НТ1080 изменение состояния везикулярного компартмента, выявляемое с помощью лизотрекера, наблюдали при действии обоих растительных гормонов – АБК и ГК, но эти изменения не затрагивали ультраструктуру везикул. Снижение яркости окрашивания везикул кислого компартмента может быть связано с уменьшением клеточного пула везикул, в частности лизосом, в результате влияния растительных гормонов. Сходное снижение интенсивности окрашивания лизотрекером красным наблюдали в перитонеальных макрофагах мыши при воздействии углеродных наноматериалов (оксида графена и одностенных углеродных нанотрубок), что было интерпретировано авторами исследования как снижение количества лизосом (Wan et al., 2013). Кроме того, снижение яркости окрашивания везикул кислого компартмента может быть вызвано изменением значения рН внутри везикул при воздействии АБК и ГК, так как яркость окрашивания использовавшегося в настоящей работе лизотрекера зависит от рН. Защелачивание лизосом может происходить при нарушении работы протонных помп, обеспечивающих кислую среду внутри лизосом. При этом было показано, что увеличения значения рН на несколько десятых долей в дермальных фибробластах человека достаточно для нарушения процесса деградации карго в лизосомах из-за нарушения работы ферментов лизосом (Coffey et al., 2014).

Можно предположить, что АБК и (или) ГК влияют на работу протонных помп лизосом, в результате чего происходит увеличение значения рН и снижение яркости окрашивания лизотрекером. С другой стороны, защелачивание лизосом должно приводить к изменениям ультраструктуры этих органелл из-за нарушения деградации карго. Однако ультраструктурный анализ клеток фибросаркомы таких изменений не выявил. Возможно, это связано с тем, что мы анализировали данные на сроках инкубации, когда изменения на ультраструктурном уровне еще не проявились.

Полученные нами данные указывают на то, что секреторно-синтетическая система клеток соединительнотканного происхождения по-разному реагирует на АБК и ГК: 1) расширение цистерн ЭПР в дермальных фибробластах наблюдается при действии ГК; расширение цистерн ЭПР в клетках фибросаркомы наблюдается при действии АБК; 2) перераспределение аппарата Гольджи относительно ядра происходит в дермальных фибробластах при действии АБК и ГК; в клетках фибросаркомы наблюдается расширение цистерн аппарата Гольджи только при действии АБК; 3) в дермальных фибробластах появляется множество гетерогенных по форме и размеру везикул при действии АБК; в клетках фибросаркомы изменяется характер окрашивания везикул кислого компартмента при действии АБК и ГК.

Ранее нами было показано, что в нормальных и опухолевых клетках человека эпидермоидного происхождения АБК и ГК вызывают морфологические изменения компонентов секреторно-синтетической системы: при действии АБК и ГК в иммортализованных кератиноцитах линии НаСаТ и клетках эпидермоидной карциномы А431 наблюдали усиление выраженности ЭПР и гипертрофические изменения аппарата Гольджи (Вильданова и др., 2014). Таким образом, реакция на АБК и ГК секреторно-синтетической системы нормальных и опухолевых клеток соединительнотканного и эпидермоидного происхождения различается. Специфичность реакции клеток соединительнотканного происхождения может быть связана с разными мишенями лля растительных гормонов в клетках разного происхождения, а также с разными функциональными нагрузками клеток соединительной ткани и покровного эпителия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Университету Ростока (University of Rostock, Rostock, Германия), на базе которого совместно с С.А. Кузнецовым были проведены исследования с использованием лазерной сканирующей микроскопии, и Немецкой службе академических обменов (DAAD, German Academic Exchange Service).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00233) и Программы развития Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (комплекс FACSAria SORP).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вильданова М.С., Савицкая М.А., Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. 2014. Действие растительных гормонов на компоненты секреторного пути нормальных и опухолевых клеток человека. Цитология. Т. 56. № 7. С. 516.

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 8 2020

(*Vildanova M.S., Savitskaya M.A., Onishchenko G.E., Smirnova E.A.* 2014. Effect of plant hormones on the components of secretory pathway in human normal and tumor cells. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 8. P. 407.)

- Вильданова М.С., Саидова А.А., Фокин А.И., Поташникова Д.М., Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. 2019. Стресс эндоплазматического ретикулума, индуцированный жасмоновой кислотой, вызывает селективный ответ в культивируемых нормальных и опухолевых клетках эпидермального происхождения. Биохимия. Т. 84. № 9. С. 1289. (Vildanova M.S., Saidova A.A., Fokin A.I., Potashnikova D.M., Onishchenko G.E., Smirnova E.A. 2019. Jasmonic acid induces endoplasmic reticulum stress with different outcome for cultured normal and tumor epidermal cells. Biochemistry (Moscow). V. 84. P. 1047.)
- *Bernales S., Schuck S., Walter P.* 2007. ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. Autophagy. V. 3. P. 285.
- Bommiasamy H., Back S.H., Fagone P., Lee K., Meshinchi S., Vink E., Sriburi R., Frank M., Jackowski S., Kaufman R.J., Brewer J.W. 2009. ATF6α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. J. Cell Sci. V. 122. P. 1626.
- Bruzzone S., Basile G., Mannino E., Sturla L., Magnone M., Grozio A., Salis A., Fresia C., Vigliarolo T., Guida L., De Flora A., Tossi V., Cassia R., Lamattina L., Zocchi E. 2012. Autocrine abscisic acid mediates the UV-B-induced inflammatory response in human granulocytes and keratinocytes. J. Cell. Physiol. V. 227. P. 2502.
- Bruzzone 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. V. 283. P. 32188.
- Bruzzone S., Magnone M., Mannino E., Sociali G., Sturla L., Fresia C., Booz V., Emionite L., De Flora A., Zocchi E. 2015. Abscisic acid stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from 1-cells and its oral administration increases plasma glucagon-like peptide-1 levels in rats. PloS One. V. 10. ID e0140588.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140588

- *Chanclud E., Lacombe B.* 2017. Plant hormones: key players in gut microbiota and human diseases? Trends Plant Sci. V. 22. P. 754.
- *Coffey E.E., Beckel J.M., Laties A.M., Mitchell C.H.* 2014. Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP. Neuroscience. V. 263. P. 111.
- *Fingrut O., Flescher E.* 2002. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. Leukemia. V. 16. P. 608.
- *Fregno I., Molinari M.* 2018. Endoplasmic reticulum turnover: ER-phagy and other flavors in selective and non-selective ER clearance. F1000Research. https://doi.org/10.12688/f1000research.13968.1
- *Huang S., Wang Y.* 2017. Golgi structure formation, function, and post-translational modifications in mammalian cells. F1000Research. https://doi.org/10.12688/f1000research.11900.1

- *Kasamatsu A., Iyoda M., Usukura K., Sakamoto Y., Ogawara K., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K.* 2012. Gibberellic acid induces α-amylase expression in adipose-derived stem cells. Int. J. Mol. Med. V. 30. P. 243.
- Ledger P.W., Uchida N., Tanzer M.L. 1980. Immunocytochemical localization of procollagen and fibronectin in human fibroblasts: effects of the monovalent ionophore, monensin. J. Cell Biol. V. 87. P. 663.
- Lee I., Tiwari N., Dunlop M.H., Graham M., Liu X., Rothman J.E. 2014. Membrane adhesion dictates Golgi stacking and cisternal morphology. PNAS. V. 111. P. 1849.
- Lin L., Tan R.X. 2011. Cross-kingdom actions of phytohormones: a functional scaffold exploration. Chem. Rev. V. 111. P. 2734.
- *Lowe M.* 2011. Structural organization of the Golgi apparatus. Curr. Opin. Cell Biol. V. 23. P. 85.
- *Machamer C.E.* 2015. The Golgi complex in stress and death. Front. Neurosci. V. 9. P. 421. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00421
- Ogata M., Hino S., Saito A., Morikawa K., Kondo S., Kanemoto S., Murakami T., Taniguchi M., Tanii I., Yoshinaga K., Shiosaka S., Hammarback J.A., Urano F., Imaizumi K. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. Mol. Cell. Biol. V. 26. P. 9220.

- *Paroutis P., Touret N., Grinstein S.* 2004. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. Physiol. V. 19. P. 207.
- Schuck S., Gallagher C.M., Walter P. 2014. ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. J. Cell Sci. V. 127. P. 4078.
- *Song S., Tan J., Miao Y., Zhang Q.* 2017. Crosstalk of ER stressmediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. J. Cell. Physiol. V. 233. P. 3867.
- Sriburi R., Jackowski S., Mori K., Brewer J.W. 2004. XBP1 a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. V. 167. P. 35.
- Wan B., Wang Z.X., Lv Q.Y., Dong P.X., Zhao L.X., Yang Y., Guo L.H. 2013. Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. Toxicol. Lett. V. 221. P. 118.
- Wei J.H., Seemann J. 2017. Golgi ribbon disassembly during mitosis, differentiation and disease progression. Curr. Opin. Cell Biol. V. 47. P. 43.

Different Reaction of Biosynthetic System of Human Dermal Fibroblasts and Fibrosarcoma Cells to Plant Hormones

E. P. Turishcheva^{*a*}, *, M. S. Vildanova^{*a*}, D. M. Potashnikova^{*a*}, and E. A. Smirnova^{*a*}

^aLomonosov Moscow State University, Department of Cell Biology and Histology, Moscow, 119991 Russia *e-mail: kitten-caterina@vandex.ru

Plant hormones are signal molecules regulating plant growth and development. Some plant hormones are known as medicine, while the effect of other hormones is less known and therefore needs to be characterized. The aim of this study was to investigate the effect of 2 mM concentration of plant hormones abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA) on the biosynthetic system (endoplasmic reticulum (ER), Golgi apparatus, acidic compartment vesicles) of cultured human dermal fibroblasts and HT1080 human fibrosarcoma cells. Using light and electron microscopy, we demonstrated that the components of the biosynthetic system of these cell lines reacted differently to ABA and GA. In particular, the expansion of ER cisternae was observed in dermal fibroblasts after exposure to GA, but in fibrosarcoma cells – after exposure to ABA. The redistribution of the Golgi apparatus around the nucleus occurred in dermal fibroblasts after both ABA and GA treatment, but was not observed in fibrosarcoma cells. However, the expansion of Golgi apparatus cisternae was observed in fibrosarcoma cells after ABA treatment. The changes of acidic compartment vesicles were observed in dermal fibroblasts after incubation with ABA and only on the ultrastructural level, and displayed as the appearance of numerous vesicles with multilayered content in the lumen. On the contrary, in fibrosarcoma cells the differences were revealed after both ABA and GA treatment and were detected by lysotracker staining. Thus, the response of the biosynthetic system in the connective-tissue cells to ABA and GA differs in normal and tumor cell lines, and also from the response described previously for the cells of epidermoid origin.

Keywords: abscisic acid, gibberellic acid, biosynthetic system, fibroblasts