

## КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576.35

### ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА И ИНГИБИТОРОВ $Ca^{2+}$ -КАНАЛОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ИНФУЗОРИЙ

#### *Tetrahymena pyriformis*

© 2012 г. И. В. Шемарова\*, Г. В. Селиванова, Т. Д. Власова

Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

\*Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, д. 44

Поступила в редакцию 04.05.10 г.

Окончательный вариант получен 23.08.11 г.

Установлено, что у инфузорий *T. pyriformis* под действием активатора (кофеина) и ингибиторов  $Ca^{2+}$ -каналов (верапамила),  $NiCl_2$  и  $CdCl_2$  происходит изменение содержания ДНК в макронклеусах. Кофеин (10 мМ) стимулирует синтез ДНК. Верапамил (5 мкМ),  $CdCl_2$  (125 мкМ),  $NiCl_2$  (100 мкМ) понижают содержание ДНК в макронклеусах уже к 30 мин после пролиферативной стимуляции. К 4 ч инкубации в макронклеусах тетрахимен, предобработанных верапамилем, содержится в среднем на 10% меньше ДНК, чем в контрольных клетках. Клетки, предобработанные  $CdCl_2$  и  $NiCl_2$ , отличаются от контрольных более низким содержанием ДНК практически на всех исследуемых сроках, но к 4 ч, восстанавливают уровень ядерной ДНК. Предполагается, что передача пролиферативных сигналов у *T. pyriformis* носит  $Ca^{2+}$ -зависимый характер.

**Ключевые слова:** *Tetrahymena pyriformis*, внутриклеточная сигнализация, пролиферация,  $Ca^{2+}$ , кофеин, верапамил,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , клеточный цикл.

Одноклеточные микроорганизмы представляют собой типичный пример системы с индуцированным синтезом ДНК и являются удобным объектом для изучения механизмов передачи и реализации митогенного сигнала в клетках эукариот.

В предыдущем исследовании мы обнаружили различия в действии кофеина на *Tetrahymena pyriformis*, стимулированные и не стимулированные эпидермальным фактором роста (ЭФР). Тогда же было показано, что ингибиторы PLC и PKC (соединение U73122 и хелететрин соответственно) существенно замедляют скорость синтеза ДНК (Шемарова и др., 2008). В клетках позвоночных животных действие PLC и PKC на пролиферацию связывают, прежде всего, с их способностью фосфорилировать субстраты, изменение активности которых в свою очередь влияет на активность  $Ca^{2+}$ -зависимых MAP-киназ (Нео et al., 2006; Lee et al., 2006). У одноклеточных изменение активности  $Ca^{2+}$ -зависимых киназ, вызванное повышением концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , также является индуктором различных программируемых процессов (Шемарова, Нестеров, 2005), включая пролиферацию (Roisin et al., 2000). В связи с вышеизложенным, нам представлялось важным продолжить начатые исследования и выяснить, каким образом повлияет на синтез ДНК предобработка *T. pyriformis* активатором и ингибиторами  $Ca^{2+}$ -каналов.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Экспериментальная часть работы была выполнена на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* (амикронуклеусный штамм GL), выращиваемых асептически при 28°C в среде следующего состава: 100 мг/л NaCl, 10 мг/л KCl, 10 мг/л  $CaCl_2$  и  $MgCl_2$ , 20 мг/л  $NaHCO_3$ , 1 г/л сухого экстракта бычьей печени (“Difco”, США), 15 г/л пептона (Richter, Венгрия), 2 г/л сухого дрожжевого экстракта (“Serva”, Германия) и 0.1 мл/л трисульфата. Условия выращивания клеток описаны ранее (Шемарова и др., 2002). В качестве исходной использовали 48-часовую культуру, в которой клетки находились в стационарной фазе роста (Ирлина, Меркулова, 1975). В опытные пробы объемом 5.0 мл добавляли 0.01 мл тестируемых веществ: 500 мМ кофеина, 2.5 мМ верапамила, 50 мМ хлористого никеля, 62.5 мМ хлористого кадмия. Пробы инкубировали 30 мин при 28°C, затем центрифугировали 5 мин при 2000 об/мин, после чего отмывали от веществ минеральной средой Лозина-Лозинского и повторно центрифугировали при тех же условиях. К осадку опытных и контрольных клеток объемом 0.3 мл добавляли 0.7 мл свежей питательной среды (СПС). Сразу после добавления СПС 0.05 мл культуры из контрольной пробы фиксировали на предметном стекле (два микропрепарата) для последующего определения содержания ДНК в ядрах тетрахимен в

Влияние кофеина и ингибиторов Ca<sup>2+</sup>-каналов на содержание ДНК (отн. ед.) в ядрах *Tetrahymena pyriformis*

Сроки фиксации клеток, ч	Контроль	Верапамил	Кофеин	Cd <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
0	4.87 ± 0.16	—	—	—	—
0.5	5.48 ± 0.16	4.75 ± 0.18	6.69 ± 0.16	4.53 ± 0.18	4.78 ± 0.15
1.0	5.54 ± 0.14	5.16 ± 0.15	6.69 ± 0.20	4.73 ± 0.17	5.44 ± 0.14
1.5	5.82 ± 0.14	4.68 ± 0.14	6.30 ± 0.17	5.24 ± 0.17	5.43 ± 0.19
2.0	5.44 ± 0.13	5.26 ± 0.14	6.35 ± 0.18	5.32 ± 0.16	4.59 ± 0.14
2.5	5.02 ± 0.15	5.62 ± 0.15	7.28 ± 0.18	5.15 ± 0.16	4.98 ± 0.15
3.0	6.00 ± 0.17	5.75 ± 0.15	6.34 ± 0.19	5.26 ± 0.18	5.24 ± 0.15
3.5	5.24 ± 0.15	5.03 ± 0.15	5.69 ± 0.14	6.12 ± 0.18	5.44 ± 0.16
4.0	5.40 ± 0.19	4.79 ± 0.16	7.51 ± 0.16	5.82 ± 0.19	5.35 ± 0.15

стартовой точке (0 мин). В дальнейшем отбор и фиксацию опытных проб проводили через каждые 30 мин на протяжении 4 ч культивирования тетрагимен при 28°C. Измерение содержания ДНК проводили в фиксированных жидкостью Карнуа и окрашенных по Фельгену микропрепаратах методом одноволновой абсорбционной цитофотометрии с использованием ядерных зондов диаметром 4, 6, 8 и 10 мкм. При этом измеряемые ядра инфузорий вписывались целиком в подобранные к их размеру зонды. Основная масса ядер вписывалась в зонды диаметром 6, 8 и 10 мкм. Фотометрирование ядер производилось при 550 нм с использованием 50× объектива. Содержание ДНК определяли по формуле:  $Q = D \times S$ , где  $D$  – оптическая плотность, создаваемая в пределах описывающих его зонда, а  $S$  – площадь зонда.

Данные представлены в виде среднearифметических значений и их ошибок, вычисленных по результатам измерения содержания ДНК в 100 клетках с обозначением доверительного интервала ( $x \pm Sx$ ). Достоверность различия средних оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

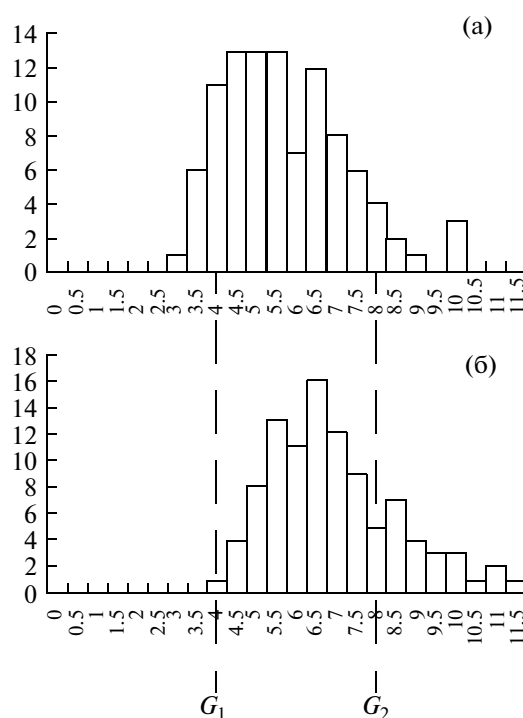
В работе использовали неорганические соли производства “Вектон” (Санкт-Петербург).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Действие кофеина.** В данных экспериментах мы изучали митогенное действие кофеина (10 мМ) на клетки, индуцированные к росту путем их переноса в СПС. В концентрации 10 мМ кофеин стимулировал синтез ДНК (таблица). Увеличение синтеза ДНК в опытных культурах отмечали уже через 0.5 ч от начала эксперимента. При этом относительное содержание ДНК в клетках, прединкубированных с кофеином, относительно контроля составило 122%. Повышенное содержание ДНК в опытных пробах отмечали практически на протяжении всего периода на-

блюдения (7 сроков из 8), причем на сроках 2.5 и 4 ч наблюдали наличие двух максимумов в содержании ДНК, превышающие максимум в контроле на 21 и 25% соответственно.

Из гистограмм распределения клеток по содержанию ДНК видно следующее. Во-первых, под действием кофеина по сравнению с контролем происходит более массовое и раннее вступление клеток в фазу  $G_2$  клеточного цикла, что может



**Рис. 1.** Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 10 мМ кофеином через 0.5 ч после культивирования в СПС (б).

По оси абсцисс – содержание ДНК, отн. ед. По оси ординат – количество клеток, % (для рис. 1–5).

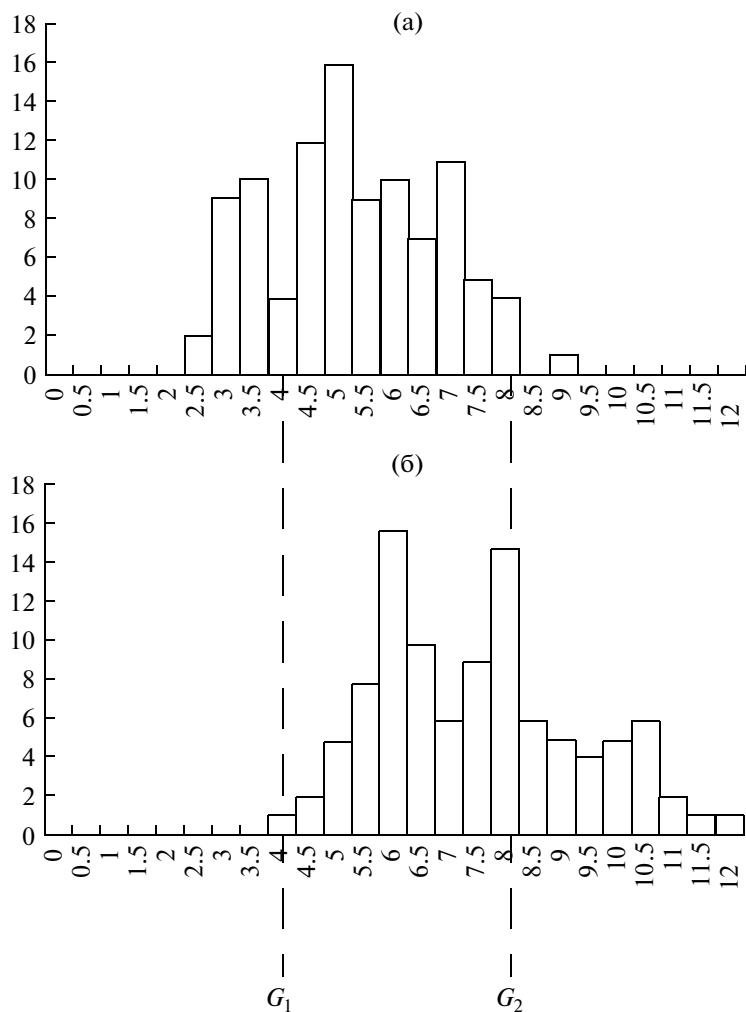


Рис. 2. Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 10 мМ кофеином через 2.5 ч после культивирования в СПС (б).

свидетельствовать о его синхронизирующем и митогенном действии на тетрахимен (рис. 1а, 1б). Во-вторых, под действием кофеина клетки быстрее вступают в фазу синтеза ДНК и соответственно в фазу деления. На это указывает распределение опытных и контрольных клеток по фазам клеточного цикла на сроке 2.5 ч (рис. 2а, 2б). Из данных гистограммы видно, что на этом сроке большая часть популяции опытных клеток находилась в фазах  $G_2/S$  и  $G_2$ , в то время как контрольные клетки – в фазах  $G_1/S$  и  $S$ . Лишь к 3-м ч в контрольной популяции стали появляться клетки, характеризующиеся удвоенным, постсинтетическим количеством ДНК в фазе  $G_2$ . В-третьих, под действием кофеина происходит более раннее вступление клеток во второй клеточный цикл, на что указывает большее по сравнению с контролем количество опытных клеток, перешедших в фазу  $G_2$  клеточного цикла к 4-м ч культивирования (данные не показаны).

Полученные данные говорят о том, что в пороговых концентрациях кофеин стимулирует синтез ядерной ДНК у *T. pyriformis*. В литературе имеются примеры, свидетельствующие о митогенном действии физиологических концентраций кофеина на клетки. В частности, отмечено, что воздействие 20 мМ кофеина на первичную культуру стромальных клеток простаты стимулирует пролиферацию (Wu et al., 2005). Сходный эффект кофеина выявлен и в отношении небласттрансформированных клеток млекопитающих (Chiarella, Puglisi, 2004; Sacks et al., 2008), почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Martin et al., 2000; Kim et al., 2008), инфузорий *Tetrahymena thermophila* (Yakisich et al., 2006) и бактерий (Lawrence et al., 2005). В то же время имеются указания и на возможность ингибирующего действия кофеина на рост клеток разных типов (Isfort et al., 1996; Desfrere et al., 2007), в том числе и клеток низших эукариот (Yeung et al., 2006).

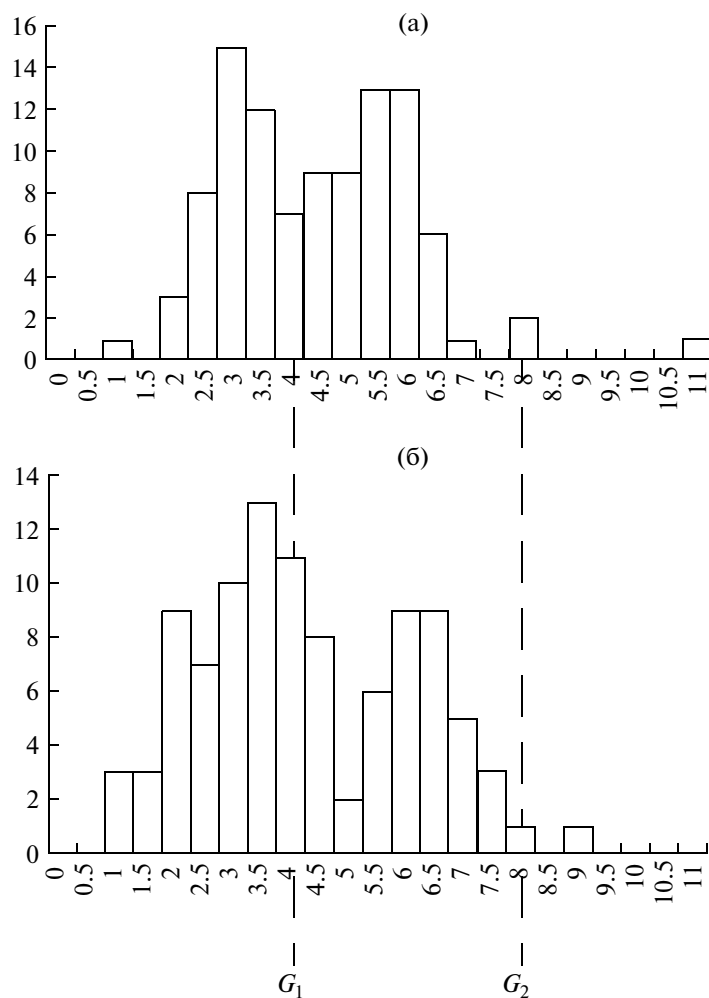


Рис. 3. Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК до и после их предобработки 5 мкМ верапамилом (а) и 125 мкМ хлористым кадмием (б) через 0.5 ч после культивирования в СПС.

Механизм митогенного действия кофеина на клетки преимущественно связывают с его Ca<sup>2+</sup>-мобилизующей функцией и коактивацией пролиферативных сигнальных путей, зависящих от кальциевого сигнала. На это указывает корреляция между степенью стимуляции рецепторов факторов роста, внутриклеточной концентрацией Ca<sup>2+</sup> и активностью протеинкиназ (Ragel et al., 2007; Furuhashi et al., 2008; Ge et al., 2009). Ингибирующий эффект кофеина на рост клеток может быть обусловлен как его воздействием на генетический аппарат клетки через Ca<sup>2+</sup>-зависимый механизм регуляции экспрессии генов раннего ответа (Isfort et al., 1996), так и прямым блокирующим действием на ключевые ядерные киназы (Lambert, Carr, 2005). По-видимому, характер ответа клеток на воздействие кофеином зависит от видовых особенностей клеточных систем и от его концентрации.

Интересно, что экспериментальные данные, полученные на одноклеточных организмах, пол-

ностью подтверждают участие Ca<sup>2+</sup> в процессах регуляции событий клеточного цикла. Так, имеются указания на то, что изменение концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> влияет на продолжительность клеточного цикла у одноклеточной водоросли *Cryptocodinium cohnii* (Yeung et al., 2006), дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Martin et al., 2000; Kim et al., 2008) и инфузорий *Tetrahymena thermophila* (Yakisich et al., 2006). Пути воздействия кофеина на протистов практически не изучены, но имеются основания полагать, что в основе его действия на синтез ДНК лежат Ca<sup>2+</sup>-зависимые механизмы регуляции активности ядерных киназ, сходные с таковыми в клетках высших эукариот (Martin et al., 2000; Yakisich et al., 2006; Kim et al., 2008).

**Действие ингибиторов Ca<sup>2+</sup>-каналов.** Для того, чтобы выяснить, насколько скорость синтеза ДНК у одноклеточных зависит от вне- и внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, в следующей серии экспериментов культуры тетрахимен мы прединкубировали с блокаторами Ca<sup>2+</sup>-каналов различных типов. Ре-

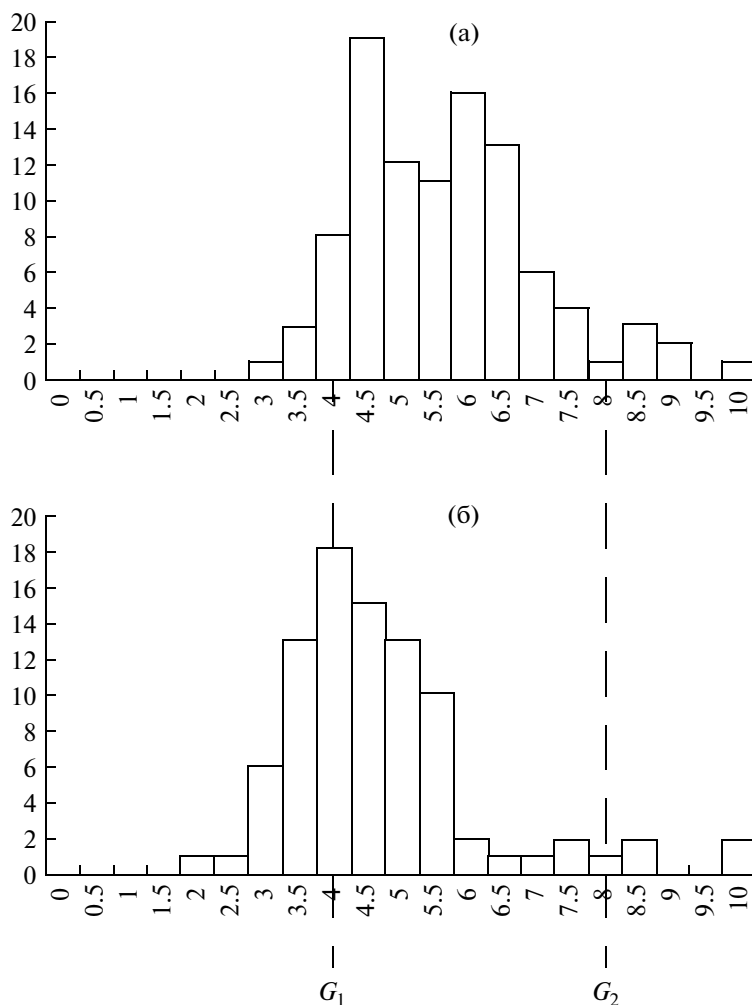


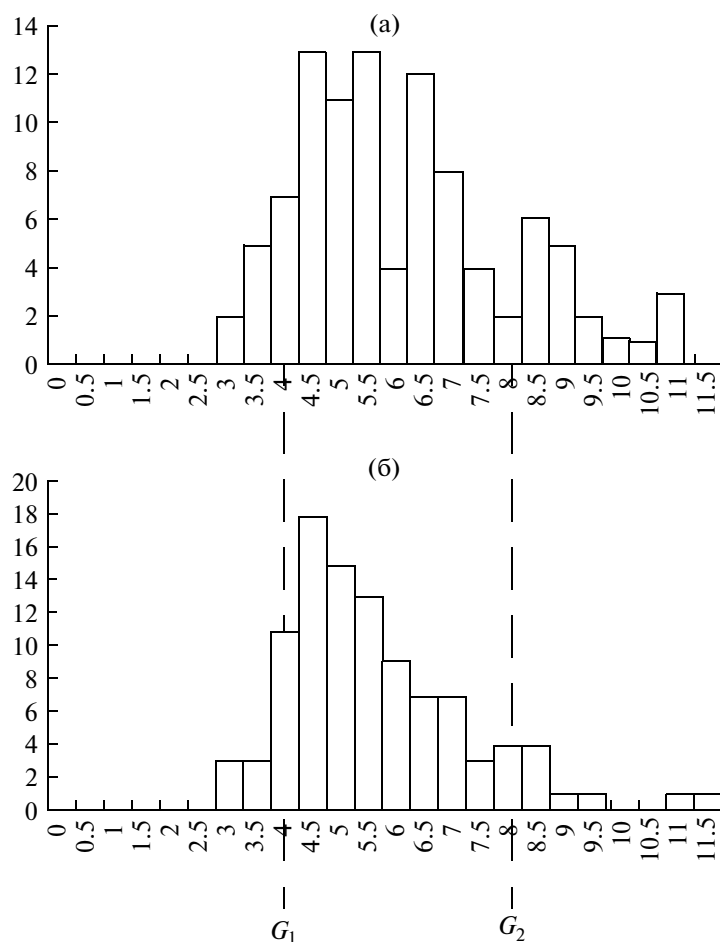
Рис. 4. Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 100 мкМ хлористым никелем (б) через 2 ч после культивирования в СПС.

зультаты опытов отражены в таблице и на рисунках 3–5.

Все испытуемые ингибиторы (верапамил,  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{NiCl}_2$ ) задерживали вступление клеток в клеточный цикл (таблица). По сравнению с контролем на нулевом сроке опытные клетки в присутствии ингибиторов дольше оставались в пререпликативном периоде, о чем свидетельствует отсутствие увеличения содержания ДНК в опытных клетках на сроке 0.5 ч. В фазу синтеза ДНК (2 ч культивирования) наименьшее содержание ДНК отмечено в клетках, прединкубированных с  $\text{NiCl}_2$ . В этом случае содержание ядерной ДНК в опытных клетках составило 87% относительно контроля на том же сроке, в то время как в клетках, прединкубированных с  $\text{CdCl}_2$  и верапамилем, – 97 и 98% соответственно. В постсинтетическую фазу на сроке 3 ч все опытные клетки имели пониженное по сравнению с контролем содержание ДНК, а именно: клетки, прединкубированные с  $\text{CdCl}_2$ , содержали в среднем 87%

ДНК, с  $\text{NiCl}_2$  и верапамилем – 87 и 96% ДНК соответственно. Вступление контрольных клеток в новый клеточный цикл отмечали на сроке 3.5 ч, что сопровождалось снижением максимального содержания ДНК в ядрах клеток. В опытных клетках снижение максимального уровня ядерной ДНК наблюдали только в клетках, прединкубированных с верапамилем, а в клетках, прединкубированных с  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{NiCl}_2$ , напротив, отмечали более высокое содержание ДНК, что может говорить о разном действии испытуемых ингибиторов на тетрахимен (подробнее эти результаты обсуждаются ниже).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что под действием верапамила и  $\text{CdCl}_2$  сразу после пролиферативной стимуляции (на сроке 0.5 ч) происходит увеличение (по сравнению с контролем) доли клеток с диплоидным содержанием ДНК (рис. 1а и 3а, 3б), что может быть связано с вступлением в цикл субпопуляции клеток, перешедших в пререплика-



**Рис. 5.** Распределение клеток *T. pyriformis* по содержанию ДНК без обработки (а) и после их предобработки 100 мкМ хлористым никелем через 4 ч после культивирования в СПС (б).

тивный период в фазе  $G_2/M$  (Епифанова и др., 1988). По-видимому, именно они влияют на смещение показателей гистограммы вправо и нивелируют разницу в содержании ДНК в контрольных и опытных пробах на протяжении последующих фаз клеточного цикла. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что верапамил и  $Cd^{2+}$  с одной стороны инициируют деление клеток, находящихся вне клеточного цикла в фазе  $G_2/M$  (абортное клеточное деление), но с другой, тормозят синтез ДНК в клетках, вступивших в клеточный цикл в фазе  $G_1/G_0$ . Чтобы прояснить ситуацию, требуется использование более совершенных методов синхронизации клеточной культуры. Примененный в нашей работе наиболее щадящий физиологический метод синхронизации (перенос клеток в свежую питательную среду) не позволяет на этапе активации пролиферации получить однородную популяцию клеток, синхронизированных в фазе  $G_1$  клеточного цикла, что затрудняет интерпретацию полученных результатов (Шемарова и др., 2002). Интересно, что на сроке 3.5 ч (соответствующем

постмитотической фазе клеточного цикла) в опытных культурах, прединкубированных с верапамилем, обнаруживались полиплоидные клетки. Такие же клетки наблюдали исследователи, использующие жесткие условия ядерной синхронизации (Scherbaum, Zeuthen, 1954; Zeuthen, 1971). По-видимому, их появление обусловлено нарушением верапамилем репликации ДНК, что приводит к появлению aberrантных клеток, вступающих в фазу  $G_1$  второго клеточного цикла с удвоенным количеством ДНК.

В клетках млекопитающих верапамил и  $Cd^{2+}$  инициируют значительно более выраженную задержку продвижения клеток по клеточному циклу (Grier, Mastro, 1985; Paquet et al., 1990; Koo et al., 2008; Singh et al., 2009). Объясняется это тем, что в систему  $Ca^{2+}$ -зависимой регуляции программируемых клеточных процессов в клетках позвоночных животных включены мембранные белки и гены, предположительно отсутствующие у протистов (Шемарова, Нестеров, 2005). В частности, у большинства видов одноклеточных микроорганизмов отсутствуют потенциалуправ-

ляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы ( $\text{Ca}(v)$ ), через которые в электровозбудимые клетки позвоночных поступают основные потоки внеклеточного кальция. Однако у инфузорий такие каналы есть (Шемарова, Нес-теров, 2005), поэтому мы предполагаем возможность их участия в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза и, следовательно, в контроле программируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов. Полученные в этом эксперименте данные позволяют полагать, что регуляция пролиферации у тетрахимен лишь в незначительной степени зависит от  $\text{Ca}^{2+}$ , поступающего через  $\text{Ca}(v)$ -каналы. По-видимому поступающий через эти каналы  $\text{Ca}^{2+}$  участвует преимущественно в регуляции цилиарной активности, обеспечивающей специфический и практически мгновенный ответ инфузорий на механическое раздражение.

Примечательно, что ионы  $\text{Cd}^{2+}$  в наших экспериментах также не оказывали заметного действия на пролиферацию тетрахимен.  $\text{Cd}^{2+}$  относится к группе неорганических блокаторов неселективных ионных каналов плазматической мембраны и модуляторов активности  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа (Guangqin et al., 2004). На клетки позвоночных животных  $\text{Cd}^{2+}$  оказывает плеiotропное действие, а в высоких концентрациях вызывает задержку клеточного роста и апоптоз (El Azzouzi et al., 1994; Singh et al., 2009). Мы предполагаем получить результаты, свидетельствующие о сходстве в механизмах действия  $\text{Cd}^{2+}$  на клетки высших и низших эукариот. Однако полученные данные не подтвердили наших предположений. Учитывая результаты по действию на синтез ДНК верапамила, можно предположить, что внеклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ , который поступает через ионные каналы плазматической мембраны, используется исключительно для регуляции мембранной активности клеток.

Интересный результат получен нами и при использовании  $\text{NiCl}_2$ , неселективного блокатора электроуправляемых и емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Важно отметить, что в отличие от  $\text{Cd}^{2+}$  и верапамила,  $\text{Ni}^{2+}$  в наших экспериментах оказал на синтез ДНК длительное ингибирующее действие. При этом синтез ядерной ДНК снижался, по крайней мере, на протяжении двух клеточных циклов (до 4-х ч культивирования). Из представленных в таблице данных видно, что через 0.5 ч после пролиферативной стимуляции в опытных клетках, прединкубированных с  $\text{Ni}^{2+}$ , содержание ДНК в ядрах было значительно ниже, чем в контроле. Низкая митотическая активность тетрахимен, прединкубированных с  $\text{Ni}^{2+}$ , сохранялась на протяжении всего периода наблюдения (4 ч). Показательны и результаты анализа гистограмм распределения этих клеток по фазам клеточного цикла. По клеточному циклу продвигалась лишь незначительная часть популяции клеток (менее 10%), перешедшая в пререпликативный период в

фазе  $G_2/M$ , (также как и при воздействии верапамилом), а остальная часть клеточной популяции задерживалась на границе фаз  $G_1/S$ . Особенно наглядно это видно из гистограммы, представленной на рис. 4, демонстрирующей распределение клеток по содержанию ДНК через 2 ч культивирования. На момент окончания эксперимента (4 ч), когда контрольные клетки вступали во второй клеточный цикл, клетки, прединкубированных с  $\text{Ni}^{2+}$ , все еще содержали промежуточное количество ДНК (рис. 5).

В литературе имеются примеры подавления синтеза ДНК под действием  $\text{Ni}^{2+}$  (Fischer, Skreb, 2001; Moll et al., 2002; Wong et al., 2006). Большинство авторов связывает это с его блокирующим действием на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (Yang et al., 2005; Wong et al., 2006), хотя имеются доказательства и его прямого воздействия на генетический аппарат клетки (Wozniak et al., 2006; Caicedo et al., 2008; Salnikow, Zhitkovich, 2008).

Считается, что  $\text{Ni}^{2+}$  – неселективный блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов (Wong et al., 2006). Эффективность  $\text{Ni}^{2+}$  как блокатора установлена в отношении  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L- и T-типов, а также емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, управляемых высвобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из депо (Clarson et al., 2003; Yang et al., 2005). Причем ингибирующее действие  $\text{Ni}^{2+}$  в отношении емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов является наиболее выраженным (Ng, Gurney, 2001; Padar et al., 2005; Yang et al., 2005). В клетках Metazoa такие каналы локализируются в мембране  $\text{Ca}^{2+}$ -депонирующих структур, сопряженных с плазматической мембраной (Vannier et al., 1999). Важно подчеркнуть, что в их структуру входят белки TRP, активируемые временным изменением мембранного потенциала (Minke, Selinger, 1996; Vannier et al., 1999), поэтому механизм их регуляции также носит потенциал-зависимый характер. Последнее позволяет предположить наличие функциональной связи между изменением мембранного потенциала и ингибирующим действием  $\text{Ni}^{2+}$  на синтез ДНК. Ранее мы уже отмечали значительную роль мембранного потенциала в сигнальной трансдукции у низших эукариот и подчеркивали, что особо важное значение он играет в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых программируемых процессов (Шемарова, 2007). В этой связи полученные в эксперименте с  $\text{Ni}^{2+}$  результаты представляется возможным объяснить следующим образом.  $\text{Ni}^{2+}$  вызывает блокаду емкостных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, вследствие чего кальциевые депо, опустошенные в результате деполяризации мембраны в СПС, не заполняются, и митогенный сигнал из-за отсутствия кальциевой волны дальше по сигнальной цепочке не идет. Исследования с использованием методов визуализации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  позволят прояснить этот вопрос.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных представляется возможным полагать, что в *T. pyriformis* митогенный сигнальный путь носит Ca<sup>2+</sup>-зависимый характер. Этот путь активируется кофеином, который стимулирует высвобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, и блокируется NiCl<sub>2</sub>, ингибитором емкостных Ca<sup>2+</sup>-каналов, которые управляются высвобождением Ca<sup>2+</sup> из депо.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука, 1994. 288 с.
- Епифанова О.И., Полуновский В.А., Терских В.В. Регуляция размножения клеток в процессе специализации, старения и неопластической трансформации. М.: ВИНТИ. Итоги науки и техники, 1988. Т. 11. 120 с.
- Ирлина И.С., Меркулова Н.А. Выращивание больших масс *Tetrahymena pyriformis*, пригодных для биохимических исследований и синхронизация делений инфузорий // Цитология. 1975. Т. 17. № 10. С. 1208–1215.
- Шемарова И.В. Роль сдвигов мембранного потенциала на начальных стадиях проведения сигнала в клетках низших эукариот // Цитология. 2007. Т. 49. № 11. С. 952–265.
- Шемарова И.В., Нестеров В.П. Эволюция механизмов Ca<sup>2+</sup> сигнализации. Роль ионов Ca<sup>2+</sup> в передаче сигнала у низших эукариот // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2005. Т. 41. № 4. С. 303–313.
- Шемарова И.В., Нестеров В.П. Эволюция механизмов Ca<sup>2+</sup> сигнализации. Роль Ca<sup>2+</sup> в регуляции фундаментальных клеточных функций // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2008. Т. 44. № 4. С. 341–351.
- Шемарова И.В., Селиванова Г.В., Власова Т.Д. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию и синтез ДНК в клетках цилиат *Tetrahymena pyriformis* // Цитология. 2002. Т. 44. № 11. С. 1097–1103.
- Шемарова И.В., Селиванова Г.В., Власова Т.Д. Изменение содержания ДНК у стимулированных ЭФР инфузорий *Tetrahymena pyriformis* под действием кофеина, KCl и ингибиторов PLC и PKC // Цитология. 2008. Т. 50. № 11. С. 999–2004.
- Cai X. Unicellular Ca<sup>2+</sup> signaling 'toolkit' at the origin of metazoa // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. P. 1357–1361.
- Caicedo M., Jacobs J.J., Reddy A. et al. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni<sup>2+</sup> and V<sup>3+</sup> are more toxic than other metals: Al<sup>3+</sup>, Be<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mo<sup>5+</sup>, Nb<sup>5+</sup>, Zr<sup>2+</sup> // J. Biomed. Mater. Res. A. 2008. V. 86. P. 905–913.
- Chiarella P., Puglisi R., Sorrentino V. et al. Ryanodine receptors are expressed and functionally active in mouse spermatogenic cells and their inhibition interferes with spermatogonial differentiation // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 4127–4134.
- Clarson L.H., Roberts V.H., Hamark B. et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in first trimester and term human placenta // J. Physiol. 2003. V. 550. P. 515–528.
- Desfrere L., Olivier P., Schwendimann L. et al. Transient inhibition of astrocytogenesis in developing mouse brain following postnatal caffeine exposure // Pediatr. Res. 2007. V. 62. P. 604–609.
- El Azzouzi B., Tsangaris G.T., Pellegrini O. et al. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line // Toxicology. 1994. V. 88. P. 127–139.
- Fischer A.B., Skreb Y. In vitro toxicology of heavy metals using mammalian cells: an overview of collaborative research data // Arh. Hig. Rada Toksikol. 2001. V. 52. P. 333–354.
- Furuhashi I., Abe K., Sato T. et al. Thrombin-stimulated proliferation of cultured human synovial fibroblasts through proteolytic activation of proteinase-activated receptor-1 // J. Pharmacol. Sci. 2008. V. 108. P. 104–111.
- Ge C., Yu M., Petite J.N. et al. Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFKB1 // Biol. Reprod. 2009. V. 80. P. 528–536.
- Grier C.E., Mastro A.M. Mitogen and co-mitogen stimulation of lymphocytes inhibited by three Ca<sup>2+</sup> antagonists // J. Cell Physiol. 1985. V. 124. P. 131–136.
- Guangqin Z., Yu F., Dongmei Y., Xuemei H. et al. Contribution of spontaneous L-type Ca<sup>2+</sup> channel activation to the genesis of Ca<sup>2+</sup> sparks in resting cardiac myocytes // Sci. China C Life Sci. 2004. V. 47. P. 31–37.
- Heo J.S., Lee Y.J., Han H.J. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca<sup>2+</sup> influx and p44/42 MAPKs // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2006. V. 290. P. C123–C133.
- Isfort R.J., Cody D.B., Stuard S.B. et al. Calcium functions as a transcriptional and mitogenic repressor in Syrian hamster embryo cells: roles of intracellular pH and calcium in controlling embryonic cell differentiation and proliferation // Exp. Cell Res. 1996. V. 226. P. 363–371.
- Kim K.Y., Truman A.W., Levin D.E. Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal // Mol. Cell Biol. 2008. V. 28. P. 2579–2589.
- Koo J.S., Choi W.C., Rhee Y.H. et al. Quinoline derivative KB3-1 potentiates paclitaxel induced cytotoxicity and cycle arrest via multidrug resistance reversal in MES-SA/DX5 cancer cells // Life Sci. 2008. V. 83. P. 700–708.
- Lambert S., Carr A.M. Checkpoint responses to replication fork barriers // Biochimie. 2005. V. 87. P. 591–602.
- Lawrence J.R., Swerhone G.D., Wassenaar L.I. et al. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities // Can. J. Microbiol. 2005. V. 51. P. 655–669.
- Lee M.Y., Lee S.H., Kim Y.H. et al. Effect of EGF on [3H]-thymidine incorporation and cell cycle regulatory proteins in primary cultured chicken hepatocytes: involvement of Ca<sup>2+</sup>/PKC and MAPKs // J. Cell Biochem. 2006. V. 99. P. 1677–1687.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J.M. et al. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 1511–1519.



- Minke B., Selinger Z. The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996. V. 6. P. 459–466.
- Moll V., Weick M., Milenkovic I. et al. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial DNA synthesis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. V. 43. P. 766–773.
- Ng L.C., Gurney A.M. Store-operated channels mediate  $\text{Ca}^{2+}$  influx and contraction in rat pulmonary artery // *Circ. Res.* 2001. V. 89. P. 923–929.
- Padar S., Bose D.D., Livesey J.C. et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate perturbs hormone-sensitive calcium stores and blocks store-operated calcium influx pathways independent of cytoskeletal disruption in human A549 lung cancer cells // *Biochem. Pharmacol.* 2005. V. 69. P. 1177–1186.
- Paquet J.L., Brunelle G., Donnadieu E. et al. Role of external calcium on the growth of aortic smooth muscle cells in SHR // *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 1990. V. 83. P. 1179–1182.
- Ragel B.T., Couldwell W.T., Wurster R.D. et al. Chronic suppressive therapy with calcium channel antagonists for refractory meningiomas // *Neurosurg. Focus.* 2007. V. 23. P. E10.
- Roisin M.P., Robert-Gangneux F., Creuzet C. et al. Biochemical characterization of mitogen-activated protein (MAP) kinase activity in *Toxoplasma gondii* // *Parasitol. Res.* 2000. V. 86. P. 588–598.
- Sacks R.S., Firth A.L., Remillard C.V. et al. Thrombin-mediated increases in cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008. V. 295. P. L1048–L1055.
- Salnikow K., Zhitkovich A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. P. 28–44.
- Scherbaum O., Zeuthen E. Induction of synchronous cell division in mass culture of *Tetrahymena pyriformis* // *Exp. Cell Res.* 1954. V. 6. P. 221–227.
- Singh K.P., Kumari R., Pevey C. et al. Long duration exposure to cadmium leads to increased cell survival, decreased DNA repair capacity, and genomic instability in mouse testicular Leydig cells // *Cancer Lett.* 2009. V. 279. P. 84–92.
- Vannier B., Peyton M., Boulay G. et al. Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 2060–2064.
- Wong C.K., Lai T., Holly J.M. et al. Insulin-like growth factors (IGF) I and II utilize different calcium signaling pathways in a primary human parathyroid cell culture model // *World J. Surg.* 2006. V. 30. P. 333–345.
- Wozniak K., Czechowska A., Blasiak J. Nickel(II) affects poly(ADP-ribose) polymerase-mediated DNA repair in normal and cancer cells // *Z. Naturforsch. [C].* 2006. V. 61. P. 142–148.
- Wu C., Fry P.M., Sui G., Fry C.H. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in a human prostate stromal cell culture // *Neuro-urol. Urodyn.* 2005. V. 24. P. 81–88.
- Yakisich J.S., Sandoval P.Y., Morrison T.L. et al. TIF1 activates the intra-S-phase checkpoint response in the diploid micronucleus and amitotic polyploid macronucleus of *Tetrahymena* // *Mol. Biol. Cell.* 2006. V. 17. P. 5185–5197.
- Yang H., Mergler S., Sun X. et al. TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 32230–32237.
- Yeung P.K., Lam C.M., Ma Z.Y. et al. Involvement of calcium mobilization from caffeine-sensitive stores in mechanically induced cell cycle arrest in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* // *Cell Calcium.* 2006. V. 39. P. 259–274.
- Zeuthen E. Synchronization of the *Tetrahymena* cell cycle // *Adv. Cell Biol.* 1971. V. 2. P. 111–152.

## Influence of Activator and Inhibitors of $\text{Ca}^{2+}$ Channels on Proliferative Activity in *Tetrahymena pyriformis* Infusoria

I. V. Schemarova<sup>a</sup>, G. V. Selivanova<sup>b</sup>, and T. D. Vlasova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences pr. M. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

<sup>b</sup> *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

**Abstract**—It was determined that change in DNA content in macronuclei occurs in the *T. pyriformis* infusoria under the influence of an activator (caffeine) and inhibitors of  $\text{Ca}^{2+}$  channels (verapamil),  $\text{NiCl}_2$ , and  $\text{CdCl}_2$ . Caffeine (10 mM) stimulates DNA synthesis. Verapamil (5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CdCl}_2$  (125  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{NiCl}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) decrease DNA content in macronuclei by 30 min after proliferative stimulation. By 4 h of incubation, there is, on average, 10% less DNA in macronuclei of *Tetrahymena* preprocessed with verapamil than in the control cells. The cells preprocessed with  $\text{CdCl}_2$  and  $\text{NiCl}_2$  differ from the control cells by lower DNA content almost at all studied periods, but they restore the level of nuclear DNA by 4 h. It is assumed that transmission of proliferative signals in the *T. pyriformis* has a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent character.

**Keywords:** *Tetrahymena pyriformis*, intracellular signaling, proliferation,  $\text{Ca}^{2+}$ , caffeine, verapamil,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , cell cycle.