

ВЛИЯНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА В НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ОРГАНИЗАЦИЮ ЦИТОСКЕЛЕТА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК

© А. А. Айзеништадт,¹ Е. Б. Бурова,¹ В. В. Зенин,¹ Д. Е. Бобков,¹
И. В. Кропачева,¹ Г. П. Пинаев^{1, 2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ²Факультет биомедицинской физики и биоинженерии С.-Петербургского
государственного политехнического университета;
электронный адрес: bobkovde@yandex.ru

Формальдегид в концентрации 3—4 % (1.07—1.42 М) является одним из самых распространенных и известных фиксаторов органов, тканей и клеток. В настоящей работе было показано, что формальдегид в концентрации до 60 мкМ (0.0002 %) не только не оказывает негативного влияния на жизнеспособность клеток линий А431, НЕК293 и первичных крысиных фибробластов, но и вызывает увеличение пролиферативной активности клеток А431. Действие на клетки А431 можно объяснить активацией рецептора эпидермального фактора роста в результате его взаимодействия с формальдегидом.

Ключевые слова: формальдегид, пролиферация, клеточная линия А431, рецептор ЭФР.

Формальдегид широко используется в клеточной биологии в качестве фиксатора в гистологических исследованиях и при иммунофлуоресцентной микроскопии для выявления распределения в клетках белков и других молекул. Для этих целей формальдегид применяется в виде 3—4%-ного (1.07—1.42 М) раствора в соответствующем буфере. При этом клетки утрачивают жизнеспособность, но сохраняют морфологию, которой они обладали в момент фиксации. В фиксированных клетках с помощью иммунофлуоресценции можно выявить солокализацию разных белковых молекул, которая дает основание предполагать наличие взаимодействия между ними. Однако установить, действительно ли имеется взаимодействие солокализующихся молекул, только на основании результатов микроскопии невозможно, поэтому клетки лизируют, выделяют белковые комплексы и анализируют их биохимическими методами (Rosette, Karin, 1995). Недостатками такого подхода являются возможное нарушение белковых взаимодействий и разрушение лабильных белковых комплексов в процессе лизирования клеток и фракционирования выделяемых белков.

Для анализа взаимодействующих белков была предложена предварительная обработка клеток формальдегидом в низкой концентрации, которая позволила выделять из них и анализировать комплексы белков и ДНК-белковых комплексов (Hester et al., 2003; Satio et al., 2005). Разработка такого метода основывалась на данных о накоплении в клетках малых количеств формальдегида и существовании внутренних механизмов для его нейтрализации (Restani et al., 1991; Yu et al., 1998). В связи с проводимыми в нашей лаборатории исследованиями цитоплазматических мультимолекулярных белковых комплексов для их сохранения в процессе выделения также применяли предварительную обработку клеток формальдеги-

дом в низкой концентрации (Бобков и др., 2010). При этом обнаружили, что культивируемые клетки не только не погибают в результате кратковременной обработки формальдегидом, но продолжают расти и размножаться в культуре. В связи с этим настоящая работа посвящена более подробному анализу влияния формальдегида в низких концентрациях (до 100 мкМ) на пролиферативную активность и морфологию клеток А431. Для того чтобы выяснить, распространяется ли стимулирующее влияние формальдегида на пролиферацию других клеточных типов, аналогичной обработке подвергали клетки линии НЕК293 и первичные фибробласты крысы. В результате проведенных исследований выяснили, что при кратковременной обработке формальдегид оказывает существенное влияние на пролиферативную активность только клеток линии А431, очевидно в результате специфического взаимодействия с поверхностными рецепторами.

Материал и методика

В работе использовали клетки эпидермоидной карциномы человека линии А431 и клетки эмбриональной почки человека линии НЕК 293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), а также фибробласты, выделенные из сердец новорожденных крыс (любезно предоставленные Н. Б. Бильдюг). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Биолот, Россия), 2 мМ L-глутамин и 100 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Для культивирования клеток использовали пластиковые культуральные флаконы и чашки Петри (Corning-Costar, США). Для экспериментов по иммунофлуоресценции клетки наращи-

вали до плотности не более 70 % конfluence, снимали с субстрата смесью 0.25%-ного трипсина (Биолот, Россия) и 0.02%-ного версена (Биолот, Россия) в соотношении 3 : 7, затем дважды промывали бессывороточной средой DMEM с последующим центрифугированием (5 мин, 400 g). Клетки разводили до концентрации 10^5 кл./мл. Число клеток определяли с помощью камеры Горяева.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Покровные стекла, обработанные силиконом repell-silane (Pharmacia Biotech., Швеция) для придания поверхности гидрофобных свойств (Are et al., 2001), покрывали фибронектином (Sigma, США) в концентрации 20 мкг/мл в PBS в течение 24 ч при 4 °C, а затем обрабатывали 0.4%-ным бычьим сывороточным альбумином в PBS в течение 1 ч при 7 °C для предотвращения неспецифического взаимодействия клеток с субстратом. На силиконизированные покровные стекла, покрытые фибронектином, либо на обычные покровные стекла наносили по 200 мкл суспензии клеток (10^5 кл./мл) и давали клеткам прикрепиться в течение 1 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в бессывороточной среде DMEM, которую затем меняли на свежую бессывороточную среду, содержащую формальдегид в концентрации 30 мкМ. Контрольные клетки также дважды промывали бессывороточной средой. Клетки фиксировали 3.7%-ным формалином в растворе PBS (Sigma, США), после чего пермеабилizировали мембрану клеток в течение 10 мин 0.1%-ным раствором TritonX-100 (Sigma, США). Для выявления структуры актинового цитоскелета клетки окрашивали TRITC- или FITC-фаллоидином (Sigma, США) в течение 10 мин при 37 °C.

Для выяснения характера распределения рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) на поверхности клеток A431 клетки снимали с подложки 0.02%-ным раствором Версена (Биолот, Россия). Затем полученную суспензию клеток отмывали бессывороточной средой и инкубировали в течение 5 мин на льду в среде, содержащей либо не содержащей 30 мкМ формальдегида. После этого клетки метили моноклональными антителами 5A9 к рецептору ЭФР (в разведении 1 : 100) на льду в течение 20 мин, затем инкубировали с кроличьими антителами к мышиным антигенам, конъюгированными с FITC (Sigma, США), также на льду в течение 20 мин. Далее клетки фиксировали метанолом при –20 °C в течение 5 мин, после чего наносили на стекла, предварительно покрытые полилизинном. На стекло перед экспериментом наносили 100 мкл раствора полилизина (5 мг/мл) и высушивали в термостате при 37 °C. В качестве заключающей среды использовали Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция). Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica (Германия). Для возбуждения флуоресценции FITC использовали аргонный лазер с длиной волны 488 нм и He-Ne-лазер с длиной волны 543 нм для CY3 и TRITC. Раздельно сканировали сигнал FITC (флуоресценция в области 500—530 нм) и CY3 (580—640 нм) (Romijn et al., 1999). Совмещение сигналов FITC и CY3 (Merge) проводили с помощью компьютерной программы Leica Confocal Software.

Электрофорез и иммуноблотинг. Анализ изменения содержания фосфорилированной формы рецептора ЭФР в клетках, обработанных формальдегидом в концентрации 30 мкМ, проводили с помощью метода электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии 0.1 % SDS (Laemmli, 1970) и последующего иммуноблотинга. Иммуноблотинг

проводили в соответствии с ECL Western blotting protocols (Amersham, США) с использованием моноклональных антител к фосфорилированной форме рецептора ЭФР (Sigma, США) и вторых козжих антител к мышиным антигенам, конъюгированных с пероксидазой хрена (GAM-HRP) (Sigma, США). Относительную экспрессию фосфорилированной формы рецептора ЭФР оценивали при помощи денситометрии полос электрофореграмм. Измерение концентрации белка в пробах проводили по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Пролиферативную активность культивируемых клеток определяли в контроле и через 24, 48, 72 и 96 ч после 5-минутной обработки формальдегидом. Для этого измеряли оптическую плотность красителя генциан-виолета, связанного с клетками, при длине волны 570 нм. Предварительно была построена калибровочная кривая соотношения оптической плотности генциан-виолета и числа клеток. Клетки на 6—10-м пассаже, достигшие субконфлюэнтного состояния, рассевали в 96 луночные планшеты в концентрации 2000 кл./мл по 100 мкл в каждую лунку. Далее клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в бессывороточной среде DMEM в течение 2 ч, за которые клетки успевали прикрепиться к субстрату и распластаться. Затем меняли среду на новую, содержащую формальдегид в концентрации 30 мкМ (опыт), а в случае контроля — на бессывороточную среду, не содержащую формальдегида. Через 5 мин клетки отмывали бессывороточной средой DMEM и добавляли новую среду, содержащую 10 % сыворотки. Далее клетки культивировали в этой среде в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Для точки 0 ч клетки анализировали сразу после обработки формальдегидом. Для каждой точки анализировали по 10 лунок. Полученные в 5 экспериментах данные по измерению оптической плотности обрабатывали статистически с использованием коэффициента Стьюдента.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки на 6—10-м пассаже, достигшие субконфлюэнтного состояния, снимали с подложки смесью растворов трипсина с версеном, затем отмывали PBS от сыворотки и трипсина. Затем обрабатывали сапонином (Sigma, США) в концентрации 200 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее клетки обрабатывали РНКазой (100 мкг/мл) (Sigma, США) в течение 30 мин при 37 °C. Для окрашивания ДНК использовали йодид пропидия (Sigma, США) в концентрации 50 мкг/мл. Измерение проводили с помощью проточного цитометра Beckman Coulter FC500 (Франция). Полученные результаты анализировали с помощью программы WiList32. Представлены результаты не менее двух независимых экспериментов.

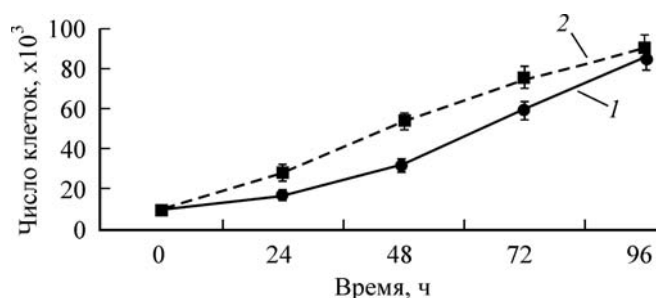


Рис. 1. Рост клеток в контроле (1) и после 5-минутной обработки формальдегидом в концентрации 30 мкМ (2).

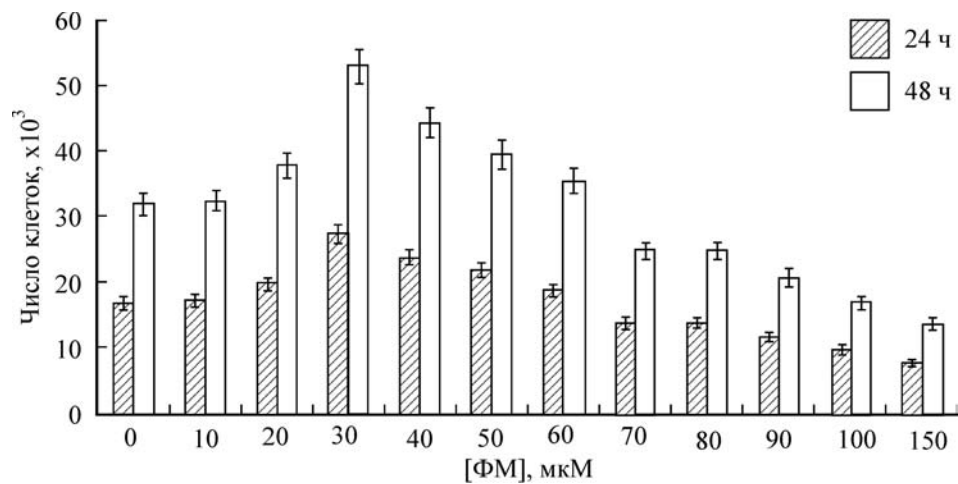


Рис. 2. Увеличение числа клеток через 24 и 48 ч в контроле и после 5-минутной обработки формальдегидом в разных концентрациях с последующим культивированием в среде без него.

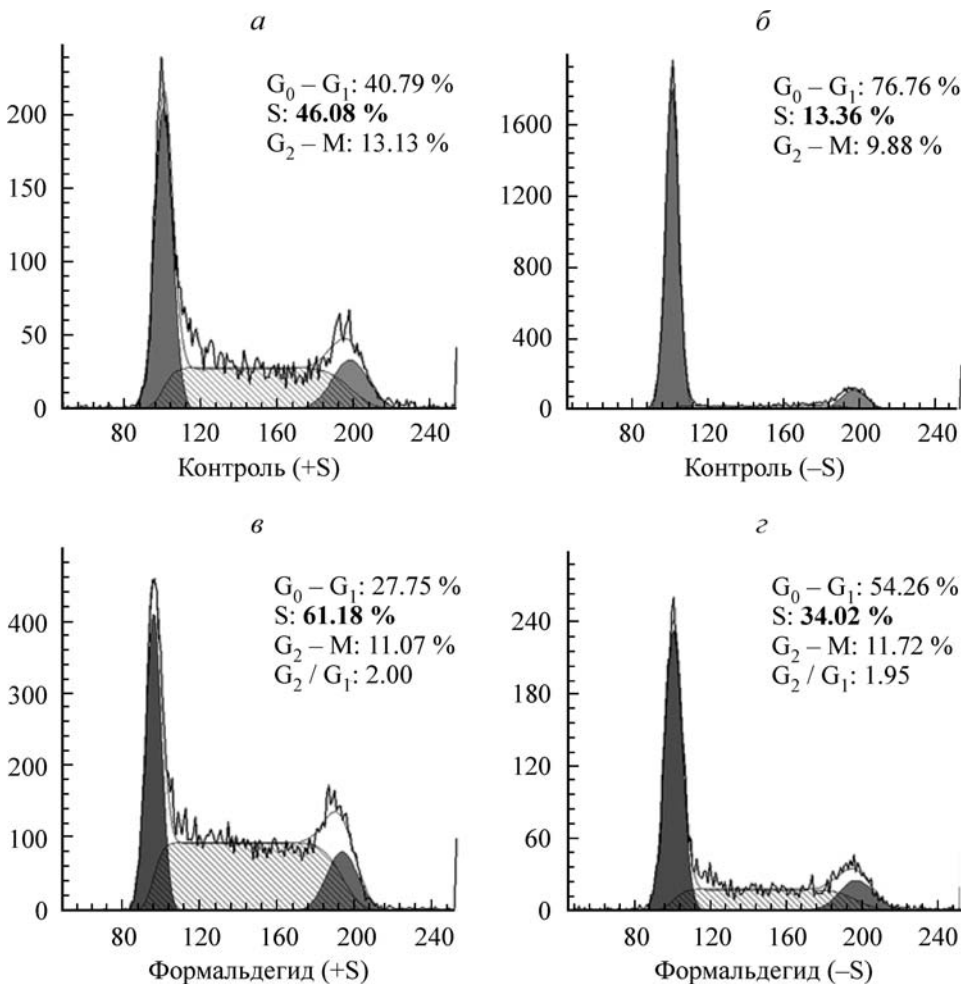


Рис. 3. Гистограммы распределения клеток линии A431 по фазам клеточного цикла через 24 ч после предварительного 5-минутного действия 30 мкМ формальдегида.

а, в — культивирование в присутствии 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (+S); б, г — в отсутствии сыворотки (-S).

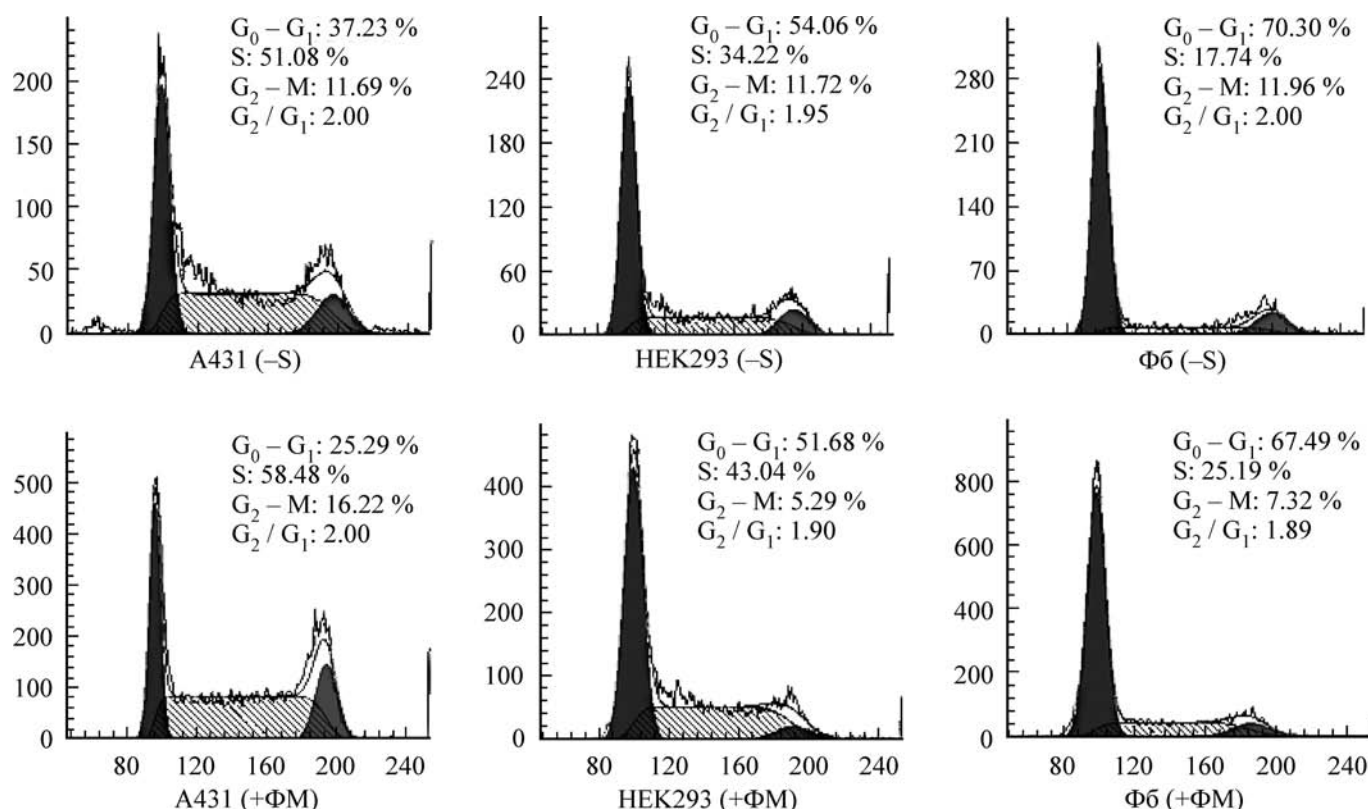


Рис. 4. Распределение клеток линий A431, HEK293 и первичной культуры фибробластов крысы (Фб) по фазам клеточного цикла через 24 ч действия формальдегида (30 мкМ) в бессывороточной среде (+ФМ).

Контрольные клетки культивировали 24 ч в бессывороточной среде (-S).

Результаты

В связи с обнаруженным ранее (Бобков и др., 2010) сохранением жизнеспособности культивируемых клеток после кратковременного воздействия на них формальдегида в низкой концентрации необходимо было выяснить, сохраняют ли они способность к дальнейшему размножению и в какой степени. С этой целью оценивали пролиферативную активность клеток A431 после 5-минутной обработки формальдегидом в концентрации 30 мкМ в течение 4 сут. Как видно на рис. 1, количество клеток после обработки значительно возрастало по сравнению с контролем уже через 24 ч культивирования. Повышенная пролиферативная активность сохранялась у обработанных клеток в течение нескольких суток.

Для того чтобы проверить, оказывает ли формальдегид такое же активирующее влияние на размножение клеток других типов, аналогичной обработке подвергали клетки линии HEK293 и первичную культуру крысиных фибробластов. Определение количества клеток в популяции после 24, 48, 72 и 96 ч культивирования показало, что кратковременная обработка 30 мкМ формальдегидом не приводит к изменению числа клеток по сравнению с контролем (данные не представлены). Следовательно, под действием формальдегида эти типы клеток не теряли жизнеспособность, но в отличие от клеток A431 у них не наблюдалось повышенной пролиферативной активности.

Следует отметить, что наблюдаемый эффект носит дозозависимый характер (рис. 2). При сохранении жизнеспособности клеток A431 формальдегид в концентрации

выше 60 мкМ вызывал снижение их пролиферативной активности по сравнению с контролем.

Для подтверждения данных об увеличении пролиферативной активности клеток линии A431 исследовали распределение клеток по фазам клеточного цикла с помощью проточной цитометрии. После 5-минутного воздействия 30 мкМ формальдегида и последующего культивирования в течение 24 ч в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, доля клеток, находившихся в фазе S, составила 61.18 (рис. 3, в) против 46.08 % в контроле (рис. 3, а). Доля клеток, находившихся в фазах G_0/G_1 , наоборот, уменьшилась по сравнению с контролем на 13.04 % и составила 27.75 % (рис. 3, в). При культивировании в бессывороточной среде контрольные клетки почти перестали делиться, и в фазе S находилось 13.36 % клеток (рис. 3, б), в то время как клетки, обработанные формальдегидом, продолжали делиться, и в фазе S находилось 34.02 % (рис. 3, г).

Распределение клеток линии HEK293 и первичной культуры крысиных фибробластов по фазам клеточного цикла не изменялось после обработки формальдегидом в течение 5 мин (данные не представлены), но незначительно изменялось при культивировании этих клеток в течение 24 ч в среде, содержащей 30 мкМ формальдегида. Доля клеток HEK293 в фазе S увеличилась на 9 % по сравнению с контролем, а доля крысиных фибробластов в S-фазе возросла на 7.5 % (рис. 4).

Перестройки актинового цитоскелета. Обработка формальдегидом в низких концентрациях приводит к быстрым и обратимым перестройкам актинового

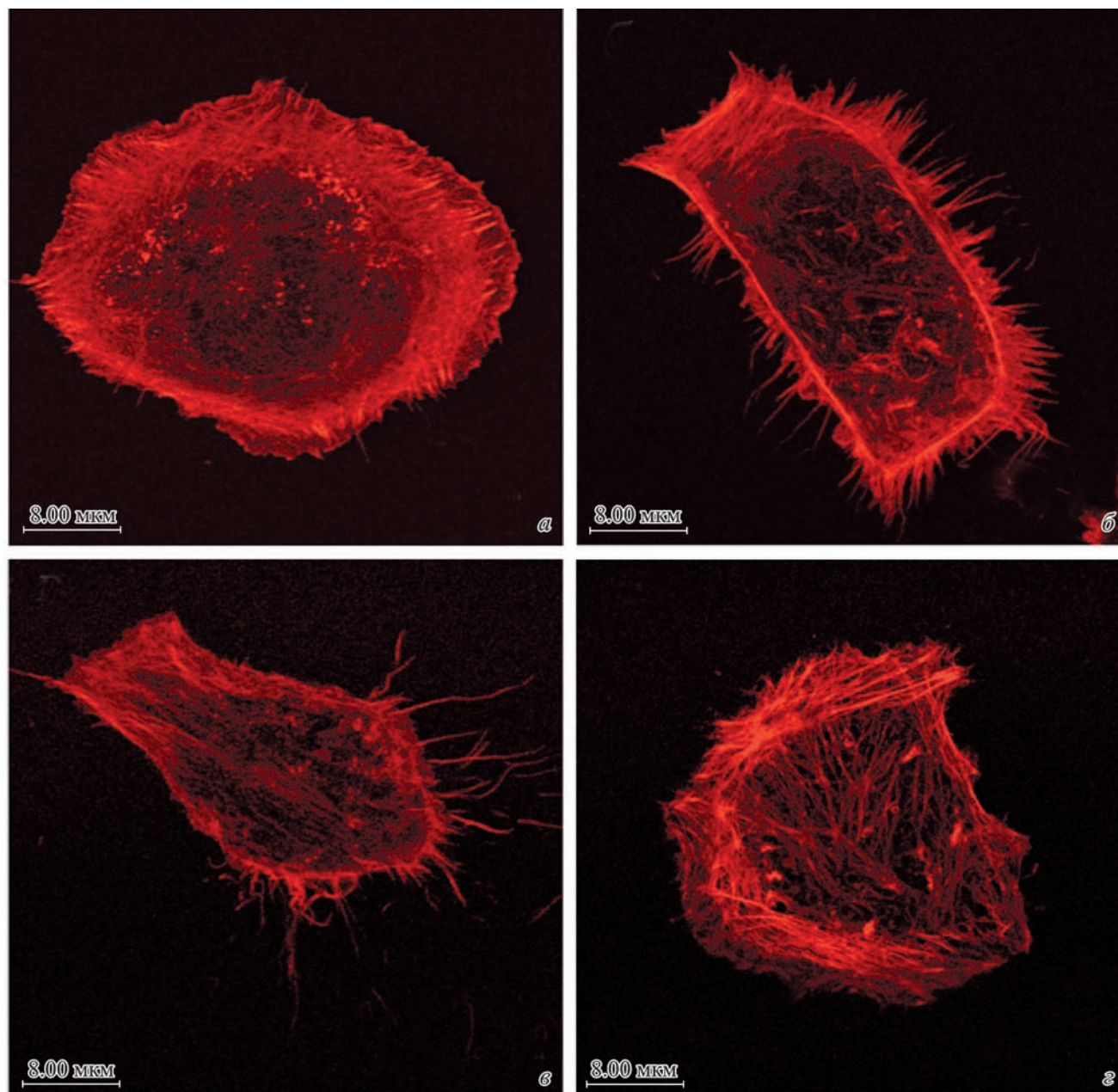


Рис. 5. Перестройки актинового цитоскелета в контрольных клетках A431 (а) и после воздействия формальдегида (30 мкМ) в течение 5 (б), 15 (в) и 30 (г) мин. Клетки распластаны на фибронектине. Окраска родамин-фаллоидином.

цитоскелета клеток линии A431 (рис. 5). Актиновый цитоскелет клеток, распластных на фибронектине и не обработанных формальдегидом, представлен собранными стресс-фибриллами и пространственной сетью микрофиламентов (рис. 5, а). Через 5 мин после обработки формальдегидом в концентрации 30 мкМ цитоскелет клетки представлен отдельными агрегатами актина, распределенными по всей клетке, кроме того, видны собранные микрофиламенты, формирующие остов филоподий (рис. 5, б). Через 15 мин наблюдается частичная сборка актиновых филаментов, причем первой собирается пространственная сеть микрофиламентов, лежащая под мембраной, в то время как в центре клетки еще остаются агрегаты актина (рис. 5, в). Через 30 мин в клетках виден полностью собранный цитоскелет, характерный для распластных на фибронектине клеток A431 — собранная

пространственная сеть микрофиламентов и пучки стресс-фибрилл (рис. 5, г). Кроме того, следует отметить, что в течение 30-минутного действия формальдегида клетки также полностью восстанавливают свою форму и возвращаются к исходному состоянию.

Таким образом, при воздействии формальдегидом в течение 30 мин в клетках происходит полная разборка актинового цитоскелета, изменение формы клеток и образование микроворсинок с последующим восстановлением структуры цитоскелета и возвращением к исходному состоянию клетки.

Чтобы посмотреть, являются ли описанные перестройки обратимыми, пространственную организацию актинового цитоскелета анализировали через 24 ч культивирования в стандартных условиях после воздействия формальдегида в концентрации 30 мкМ в течение 5, 15

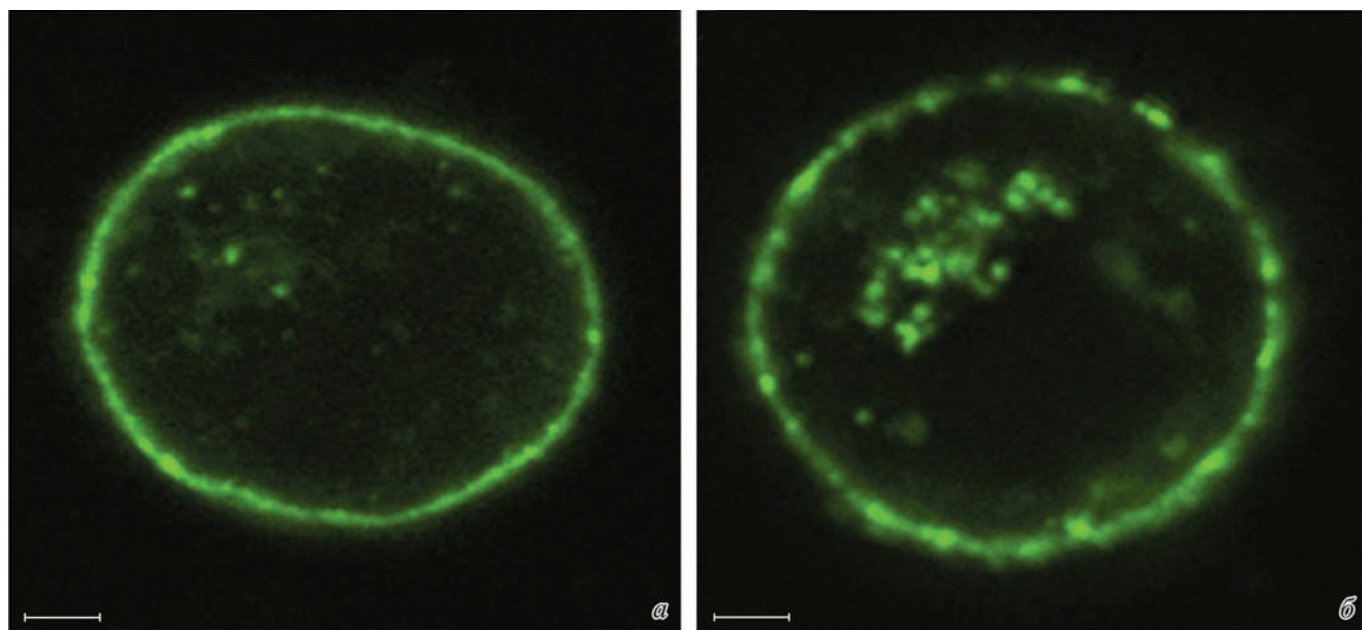


Рис. 6. Распределение рецепторов к эпидермальному фактору роста (ЭФР) на поверхности клеток линии A431 в контроле (а) и после 5-минутного воздействия формальдегида в концентрации 30 мкМ (б).

Рецептор ЭФР окрашивали моноклональными антителами 5A9 и кроличьими антителами к мышинным антигенам, конъюгированными с FITC. Масштабный отрезок — 4 мкм.

и 30 мин. Было показано, что независимо от сроков воздействия формальдегида через 1 сут цитоскелет клетки полностью собран и ничем не отличается от цитоскелета контрольных клеток (данные не представлены), что свидетельствует о том, что формальдегид в выбранной концентрации вызывает обратимые и кратковременные изменения актинового цитоскелета культивируемых клеток.

Ранее в работе Аре с соавторами (Are et al., 2001) было показано, что обработка клеток ЭФР также вызывает быстрые перестройки актинового цитоскелета в клетках линии A431, включающие в себя стадию его полной разборки. Нами были получены аналогичные данные в результате обработки клеток линии A431 формальдегидом в низкой концентрации. На основе сходства перестроек, наблюдавшихся при воздействии ЭФР и формальдегида в низких концентрациях, мы предположили, что полученные результаты по реорганизации актинового цитоскелета и увеличению пролиферативной активности клеток линии A431 могут быть связаны с взаимодействием формальдегида с рецептором ЭФР. Это может также зависеть от большого количества рецептора ЭФР на поверхности клеток A431 (Kageyama et al., 1988). Возможно, формальдегид вызывает димеризацию соседних рецепторов, образуя ковалентные сшивки между близкорасположенными белками. Подтверждением такому предположению служат результаты, полученные методом конфокальной микроскопии: было выявлено образование пэтчей рецепторов на поверхности клеток A431, обработанных формальдегидом в концентрации 30 мкМ в течение 5 мин при 0 °C, в то время как на поверхности контрольных клеток рецептор ЭФР распределен равномерно (рис. 6).

Только кластеризация рецептора ЭФР не является свидетельством его активации, поэтому необходимо было выяснить, изменяется ли содержание фосфорилированной формы рецептора ЭФР в ответ на воздействие формальдегидом в низкой концентрации. Проведенный электрофоретический анализ с последующим Вестерн-блотом

показал, что действительно после обработки клеток A431 в течение 10 мин формальдегидом в концентрации 30 мкМ в клетках возрастает содержание фосфорилированной формы рецептора ЭФР, что свидетельствует о его активации (рис. 7).

Полученные результаты, таким образом, свидетельствуют о том, что формальдегид в концентрации до 60 мкМ действует на клетку подобно ЭФР.

Обсуждение

Результаты настоящей работы продемонстрировали, что формальдегид в концентрации до 100 мкМ не снижает жизнеспособность культивируемых клеток. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными, свидетельствующими о наличии в клетках механизмов нейтрализации формальдегида, поскольку существуют его эндогенные источники; например, формальдегид образуется в ходе метаболизма глицина, метионина, серина и холина (Restani et al., 1991).

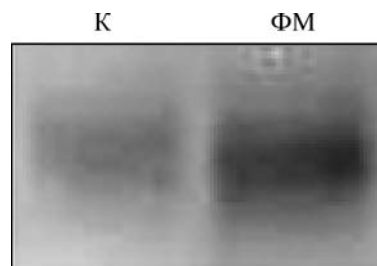


Рис. 7. Изменение содержания фосфорилированной формы рецептора ЭФР в клетках A431 при 10-минутном действии формальдегида (30 мкМ).

К — контроль, ФМ — формальдегид. Уровень фосфорилированной формы рецептора ЭФР в лизатах клеток определяли методом иммуноблотинга.

Согласно полученным нами результатам, формальдегид в низкой концентрации (30 мкМ) не только не снижал жизнеспособность культивируемых клеток, но и вызывал значительное увеличение пролиферативной активности клеток А431. В то же время, пролиферативная активность клеток линии НЕК293 и первичной культуры крысиных фибробластов не изменялась после кратковременного воздействия формальдегида, но повышалась при длительном (в течение 1 сут) культивировании в присутствии 30 мкМ формальдегида. Увеличение пролиферативной активности клеток линии НЕК293 при воздействии формальдегидом уже было описано ранее (Qian et al., 2007). Авторы показали, что влияние формальдегида на пролиферацию исследованных клеток зависит от его содержания в окружающей среде: в концентрации свыше 100 мкМ формальдегид снижал пролиферацию культивируемых клеток, а при концентрации 10–60 мкМ, наоборот, повышал. Следует, однако, заметить, что в упомянутой работе исследовали только длительное (24 ч) воздействие формальдегида, в то время как в наших экспериментах минимальное время воздействия составляло 5 мин. Полученные результаты по увеличению пролиферативной активности клеток НЕК293 могут быть объяснены исходя из литературных данных, согласно которым формальдегид вызывает фосфорилирование киназ р38МАР и ERK1/2 (Feick et al., 2006). Как известно, ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases) — киназы, регулируемые внеклеточными сигналами и активирующиеся при воздействии митогенов, повышают пролиферативную активность клеток и являются одним из ключевых регуляторов клеточного цикла (Meloche et al., 1992). Активация же киназы р38МАР в ответ на стрессовые воздействия на клетку вызывает остановку клеточного цикла, киназа р38МАР является нечувствительной к ростовым факторам (Han et al., 1994). Был показан конкурентный характер активации р38МАР и ERK1/2 в ответ на действие цитокинов IL-1, IL-6 и TNF- α (Murakami-Mori et al., 1995). Возможно, подобная картина конкурентного фосфорилирования наблюдается и при обработке формальдегидом, что объясняет зависимость характера (повышение или понижение) и степени изменения пролиферативной активности от концентрации формальдегида, полученных в упоминавшейся выше работе (Qian et al., 2007). С другой стороны, существуют данные по индуцируемому формальдегидом увеличению экспрессии ряда белков, влияющих на пролиферацию клеток. Так, формальдегид повышает экспрессию таких ростовых факторов, как NGF (Hester et al., 2003), EGF и α -PDGF, а также рецепторов к ним (Lee et al., 2008).

Возможным объяснением повышения экспрессии некоторых генов при воздействии формальдегида может служить образование временных ДНК-белковых сшивок, в том числе образование сшивок между ДНК и транскрипционными факторами (Hester et al., 2003; Saito et al., 2005).

Полученные нами результаты по увеличению пролиферативной активности клеток А431 в ответ на кратковременное воздействие формальдегидом могут иметь и другое объяснение. Клетки А431 характеризуются повышенным содержанием на своей поверхности рецептора ЭФР. Образование пэтчей рецептора ЭФР и увеличение содержания его фосфорилированной формы могут объясняться взаимодействием формальдегида с рецептором ЭФР. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что изменение организации актинового цитоскелета и индукция увеличения пролиферативной активности клеток

А431 тоже могут быть результатом взаимодействия формальдегида с рецептором ЭФР.

Таким образом, формальдегид в низкой концентрации может рассматриваться как сигнальная молекула, вызывающая целый ряд перестроек актинового цитоскелета, влияющих на изменение пролиферативной активности клеток А431.

Список литературы

- Бобков Д. Е., Кропачева И. В., Пинаев Г. П. 2010. Мульти-молекулярные комплексы, содержащие р65 субъединицу фактора NF κ B и белки цитоскелета в клетках А431. Биол мембр. 27 : 133—137.
- Are A., Pinaev G., Burova E., Lindberg U. 2001. Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganization of the microfilament system. Cell Motil. Cytoskeleton. 48 : 24–36.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 71 : 248—254.
- Feick P., Haas S. R., Singer M. V., Bocker U. 2006. Low-dose exposure of intestinal epithelial cells to formaldehyde results in MAP kinase activation and molecular alteration of the focal adhesion protein paxillin. Toxicology. 219 : 60—72.
- Han J., Lee J.-D., Bibbs L., Ulevitch R.J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science. 265 : 808—811.
- Hester S. D., Benavides G. B., Yoon L., Morgan K. T., Zou F., Barry W., Wolf D. C. 2003. Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium. Toxicology. 187 : 13—24.
- Kageyama R., Merlino G. T., Pastan I. 1998. Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor. J. Biol. Chem. 273 : 6329—6336.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Lee M., Kim Y., Na Y., Kim S.-H., Shin Y. K., Lee B.-H., Shin H.-S. and Lee M.-O. 2008. Identification of formaldehyde-responsive genes by suppression subtractive hybridization. Toxicology. 243 : 224—235.
- Meloche S., Seuwen K., Pages G., Pouyssegur J. 1992. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. Mol Endocrinol. 6 : 845—854.
- Murakami-Mori K., Taga T., Kishimoto T., Nakamura S. 1995. AIDS-associated Kaposi's sarcoma (KS) cells express oncostatin M (OM)-specific receptor but not leukemia inhibitory factor/OM receptor or interleukin-6 receptor. Complete block of OM-induced KS cell growth and OM binding by anti-gp130 antibodies. J. Clin. Invest. 96 : 1319—1327.
- Qian X., Hujun H., Guangtao Y., Xu Y. 2007. Effect of formaldehyde on cellular proliferation of HEK293 cells. Bioinform. Biomed. Eng. 1 : 464—466.
- Restani P., Galli C. L. 1991. Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. Crit. Rev. Toxicol. 21 : 315—328.
- Romijn H. J., van Uum J. F. M., Bredijk I., Emmering J., Radu I., Pool C. W. 1999. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. J. Histochem. Cytochem. 47 : 229—235.
- Rosette C., Karin M. 1995. Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF κ B. J. Cell Biol. 128 : 1111—1119.
- Saito Y., Nishio K., Yoshida Y., Niki E. 2005. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. Toxicology. 1 : 235—245.
- Yu P. H., Deng Y. L. 1998. Endogenous formaldehyde as a potential factor of vulnerability of atherosclerosis: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated methylamine turnover. Atherosclerosis. 140 : 357—363.

EFFECT OF FORMALDEHYDE IN LOW CONCENTRATIONS ON THE PROLIFERATION
AND ORGANIZATION OF THE CYTOSKELETON OF CULTURED CELLS

A. A. Aizenshtadt,¹ E. B. Burova,¹ V. V. Zenin,¹ D. E. Bobkov,¹ I. V. Kropacheva,¹ G. P. Pinaev^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,
and ² Faculty of Biomedical Physics and Bioengineering, St. Petersburg State Polytechnic University;
e-mail: bobkovde@yandex.ru

3—4 % (1.07—1.42 M) formaldehyde is one of the most popular and well-known organs, tissues and cells fixer. In this manuscript we have shown that formaldehyde in concentrations of up to 60 μM (0.0002 %) does not have any negative effect on the viability of cell lines A431, HEK293 and primary rat fibroblasts, but it also increases the proliferative activity of A431. The influence on A431 cells might be explained by the activation of epidermal growth factor receptors as a result of their interaction with formaldehyde.

Key words: formaldehyde, proliferation, A431 cell line, EGF receptor.