

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ИНДУКЦИЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ N1E-115

Мякишева С.Н.<sup>1</sup>, Крестинина О.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биофизики клетки РАН; г. Пущино, Московская область, Россия, Институтская 3, e-mail: myakisheva@mail.ru

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Московская область, Россия, Институтская 3

---

Мелатонин играет важную роль во многих физиологических процессах. Известны, антиоксидантные, иммуностимулирующие антипролиферативные влияния мелатонина. В работе исследовано антипролиферативное действие мелатонина в диапазоне концентраций  $10^{-6}$ М -  $10^{-5}$ М на культуру клеток нейробластомы мыши N1E-115 клон С-1300 при культивировании в среде ДМЕМ без сыворотки. Показано, что добавление мелатонина в диапазоне указанных концентраций вызывает торможение пролиферации на 25-35% клеток нейробластомы, а также индукцию дифференцировки на 2-4 сутки культивирования. Полученные результаты о влиянии мелатонин на изменение пролиферации, которое проявляется в торможении пролиферативной активности и индуцировании дифференцировки при культивировании клеток нейробластомы мыши N1E-115, позволяют считать его препаратом противоопухолевого действия.

---

Ключевые слова: мелатонин, культура клеток, нейробластома, пролиферация, дифференцировка

## STUDY THE EFFECT OF MELATONIN ON THE PROLIFERATION AND AN INDUCTION OF THE DIFFERENTIATION OF MOUSE N1E-115 NEUROBLASTOMA CELLS

Myakisheva S.N.<sup>1</sup>, Krestinina O.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biophysics of RAS, Puschino, Moscow region, Russia, e-mail: myakisheva@mail.ru

<sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region, Russia

---

Melatonin plays an important role in many physiological processes. Antiproliferative, antioxidant, immunostimulating actions of melatonin is known. In our work we evaluated the antiproliferative role of melatonin on the mouse neuroblastoma N1E-115 clone C-1300 cell culture. Research conducted under cultivation in the serum-free DMEM media with the addition of melatonin in the concentration range  $10^{-6}$ M to  $10^{-5}$ M. We showed that adding melatonin in the range of the indicated concentration caused inhibition of proliferation 25-35% of the cells and the induction of differentiation for 2-4 days of cultivation. Thus, it is shown that melatonin affects the change of proliferation, which to be appeared in the inhibition of the proliferative activity and induction of differentiation when cultured mouse neuroblastoma cells N1E-115 cells. We consider that melatonin can be used as an anticancer compound.

---

Keywords: melatonin, cell culture, neuroblastoma, proliferation, differentiation

Мелатонин – гормон эпифиза, является эндогенным антиоксидантом, липофильным по природе и играет важную роль во многих физиологических процессах [8]. Он обладает иммуномодулирующими, антиоксидантными и антипролиферативными свойствами [3,4,10]. Было показано, что мелатонин участвует в управлении клеточной пролиферацией и дифференцировкой [2]. Кроме того, пониженный уровень собственного мелатонина наблюдали при некоторых онкологических заболеваниях, что указывает на то, что мелатонин можно рассматривать как эндогенное онкостатическое вещество [4,6]. В целом, эффект мелатонина состоит в подавлении пролиферации клеток и индукции

дифференцировки и апоптоза в ряде опухолевых линий клеток в диапазоне концентраций, от нано- до мили - молярных. [3,4,6,9].

В то же время, отмечаются разночтения в действующих концентрациях мелатонина. В работе на трансформированных клетках молочной железы (линии MCF-7), показано, что мелатонин в физиологических концентрациях ( $10^{-11}$  –  $10^{-9}$ М) на 75% подавляет пролиферацию клеток, но его эффект снимается при более высоких ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$ М) или более низких концентрациях ( $10^{-15}$  –  $10^{-13}$ М) [5]. На культуре клеток человеческой нейробластомы SK-N-MC выявлено, что мелатонин в высоких дозах ( $10^{-4}$  –  $10^{-3}$ М) ингибирует клеточную пролиферацию и стимулирует индукцию клеточной дифференцировки и клеточной гибели [4]. В работах других авторов на клетках человеческой нейробластомы SK-N-SH эффект мелатонина был отмечен в концентрациях от  $10^{-11}$  до  $10^{-9}$ М. При этом, в этих экспериментах более низкие ( $10^{-13}$ М) или более высокие концентрации ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$ М) мелатонина практически не влияли на клеточный цикл человеческой нейробластомы SK-N-SH [2]. В целом, можно отметить, что эффекты действия мелатонина на культуре клеток наблюдали в весьма широком диапазоне концентраций, что оставляет открытым вопрос определения оптимума его действия.

Задачей нашей работы было изучение динамики соотношения популяций клеток растущей культуры нейробластомы мыши N1E-115 под действием мелатонина в диапазоне концентраций  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$ М.

### **Материалы и методы исследования**

Исследования проводили на культуре клеток нейробластомы мыши N1E115 (клон С-1300). Клетки нейробластомы культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (fetal bovine serum, Flow Laboratories, Великобритания) при 37°C. В экспериментах в качестве контроля использовали среду DMEM без сыворотки и экспериментальную среду DMEM без сыворотки с добавлением мелатонина в разных концентрациях. Исследуемые препараты добавляли в культуру в логарифмической фазе роста через 24 часа после посева во флаконы. В контрольной и экспериментальной группе было не менее трех флаконов. Плотность посева в 50 мл пластиковых флаконах составляла  $5 \times 10^3$  клеток /см<sup>2</sup> при объеме среды 5 мл. Методом прижизненного наблюдения с использованием микроскопа МБИ-13 (объектив ROW Rathenon 24/0.42, окуляр 7.) проводили морфологическое исследование клеток.

Определяли общее количество клеток, а также количество пролиферирующих, дифференцированных и гибнущих (отмирающих) клеток. Подсчитывали количество каждой группы клеток в 3-5 полях зрения микроскопа в каждом из трех флаконов. Критерием нейродифференцировки было появление клеток 2-х типов: клетки обычных размеров (20-30

мкм) с длинными аксоноподобными отростками (вдвое больше диаметра клетки нейробластомы) или увеличенные по размерам клетки (до 50—70 мкм) с многочисленными отростками. Гибнущие клетки определяются как клетки округлой формы или деформированные с фрагментированной структурой ядра и цитоплазмы, как правило, неадгезированные к поверхности флакона. Пролиферирующие клетки имели округлую или овальную форму, как правило, с короткими (не больше диаметра клетки) отростками или вообще без отростков [1]. Для статистического анализа брали среднее значение числа различных клеток, вычисленное по результатам трех экспериментов (по 9 флаконов для контрольной и экспериментальной группы). Статистическую достоверность считали с использованием t-критерия Стьюдента, для уровня достоверности -  $P < 0.05$ .

### **Результаты и их обсуждение**

В работе было исследовано влияние мелатонина на пролиферацию и индукцию дифференцировки клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). При культивировании клетки распределялись на три популяции – пролиферирующие, дифференцированные и гибнущие. На рис 1 представлены морфологические изменения клеток нейробластомы в процессе культивирования. В контроле со 2-х по 4-е сутки шло постепенное нарастание числа пролиферирующих клеток (см. рис.2), что характерно для перевиваемых культур [1]. На фоне мелатонина количество пролиферирующих клеток нейробластомы не увеличивалось, что указывает на торможение пролиферации под влиянием мелатонина. Общее число клеток в поле зрения микроскопа в контрольных флаконах на 3-и сутки составило  $93 \pm 4,7$ , а в экспериментальных группах с мелатонином ( $10^{-5}M$ ) соответственно  $72 \pm 5,5$ .

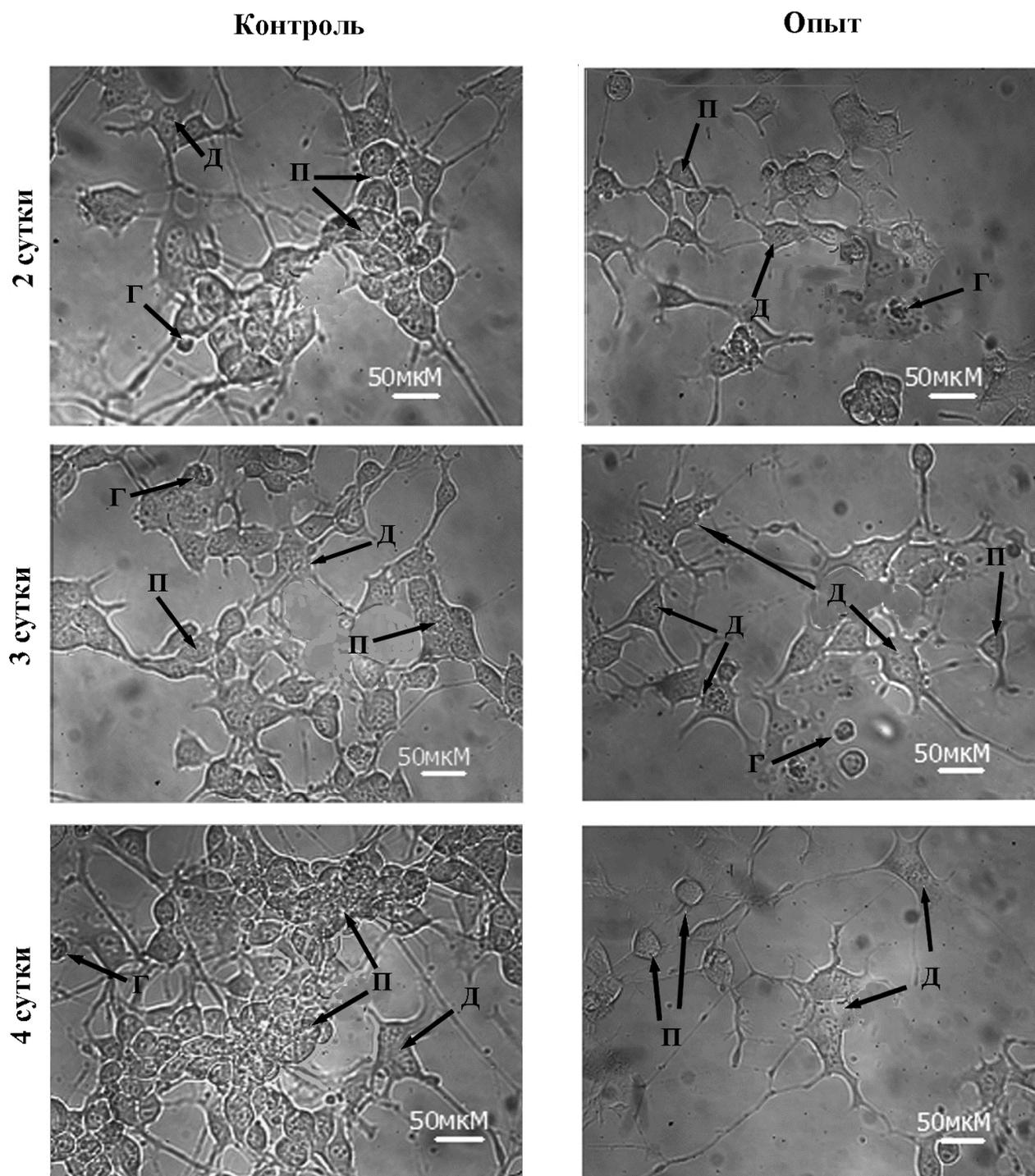
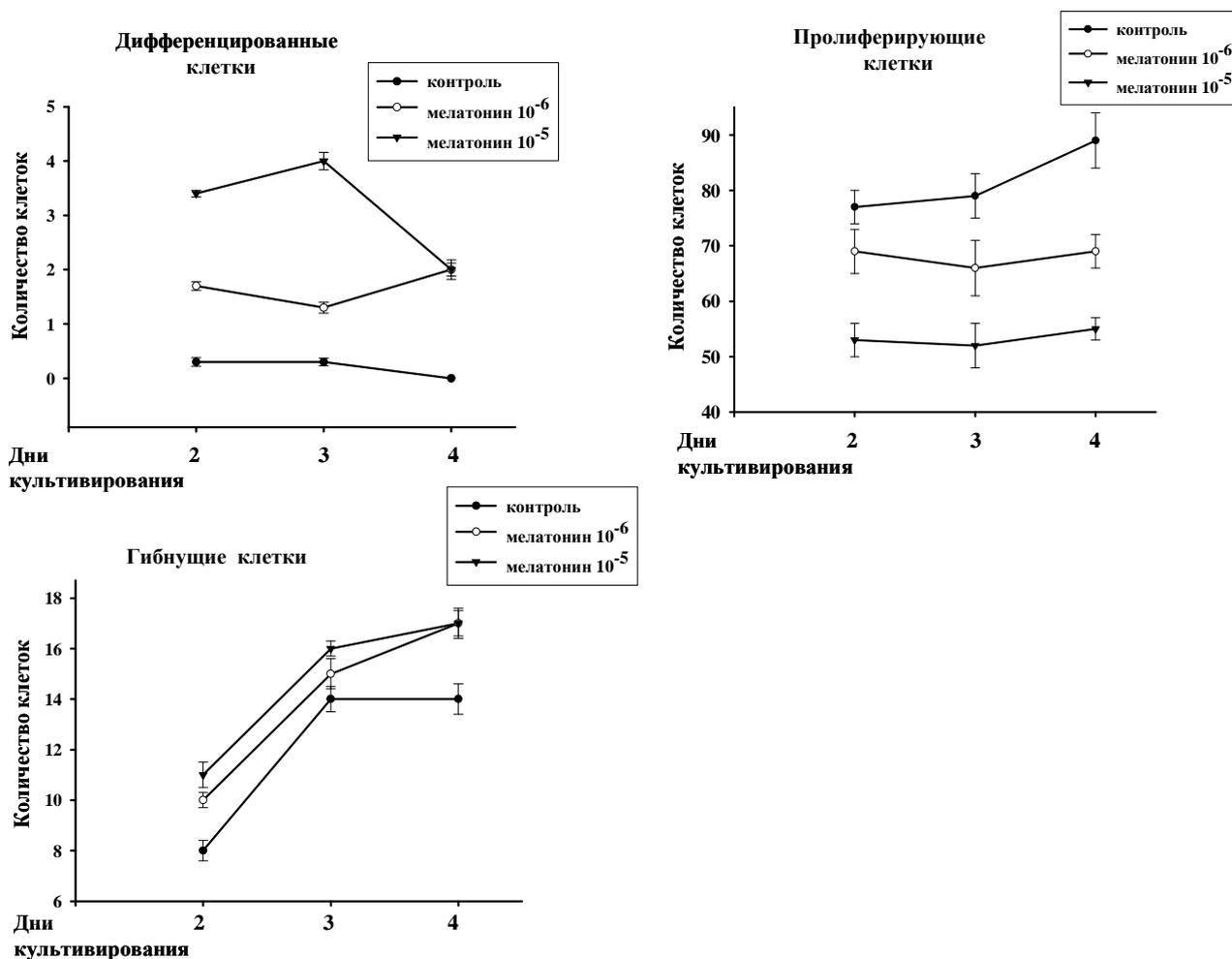


Рис. 1. Морфологический статус культуры нейробластомы мыши на фоне мелатонина ( $10^{-5}$ М) на 2 – 4 сутки культивирования. Буквами обозначены: П – пролиферирующие, Д – дифференцированные, Г – гибнущие клетки.

Анализ сгруппированных отдельно по популяциям дифференцированных, пролиферирующих и гибнущих клеток нейробластомы мыши под действием мелатонина в диапазоне концентраций  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$ М представлен на рис. 2. Показано, что количество как пролиферирующих, так и гибнущих клеток росло по мере культивирования до 4 суток. В работах других исследователей также отмечалась гибель трансформированных клеток под

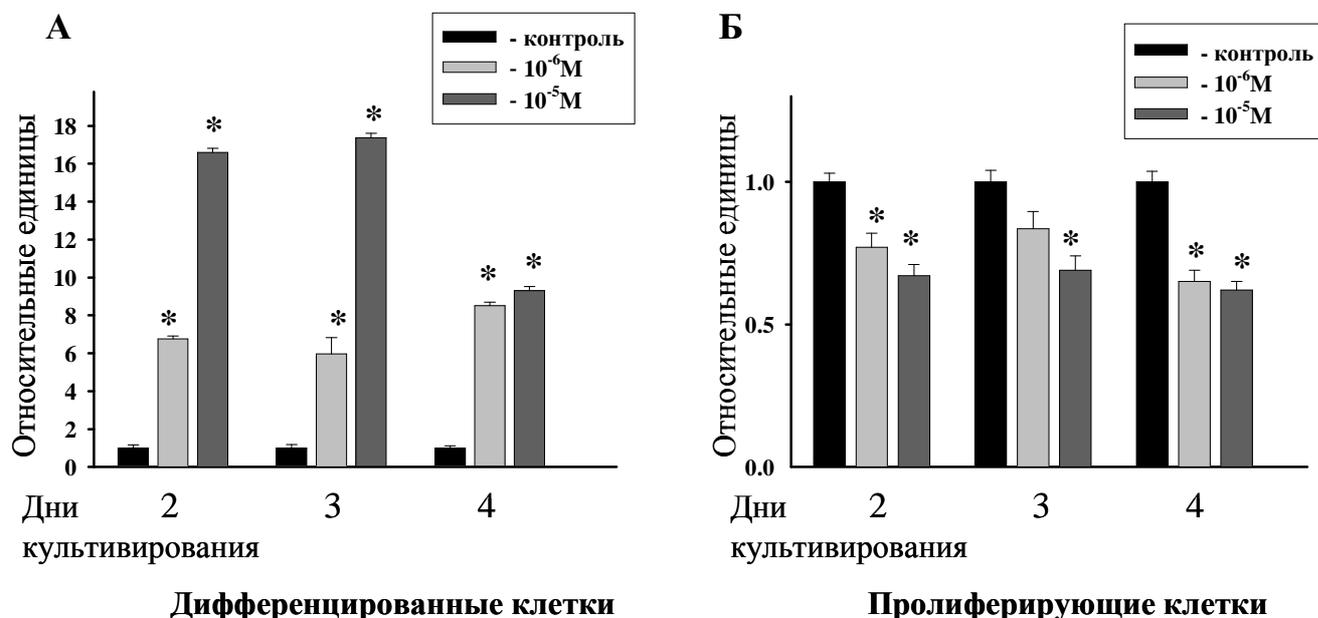
действием мелатонина [4, 5, 6, 9].



**Рис. 2.** Распределение клеток отдельно по популяциям (дифференцированные, пролиферирующие и гибнущие) при культивировании в контроле и под действием мелатонина в концентрациях  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$ М.

Количество дифференцированных клеток в контроле медленно падало по мере культивирования. Из литературы известно, что количество дифференцированных клеток в пролиферирующей культуре не увеличивается [1]. Мелатонин в концентрации  $10^{-5}$ М увеличивал количество дифференцированных клеток на 3-и сутки культивирования, а затем количество дифференцированных клеток уменьшалось к 4 дню культивирования. При этом под действием мелатонина в концентрации  $10^{-6}$ М наблюдалось более медленное нарастание дифференцировки к 4-м суткам культивирования. Что касается контроля, то количество дифференцированных клеток не увеличивалось, а уменьшалось к 4-м суткам культивирования. Уменьшение количества дифференцированных клеток на 4 сутки при культивировании с мелатонином  $10^{-5}$ М, по-видимому, связано с тем, что происходит гибель дифференцированных клеток по типу апоптоза. Используемые нами концентрации

существенно выше концентраций, активных для клеток молочной железы [5] и клеток человеческой нейробластомы SK-N-SH [2], но ниже, чем для клеток другой человеческой нейробластомы SK-N-MC [4]. Мелатонин в исследованных концентрациях блокировал рост количества пролиферирующих клеток. Этот феномен торможения пролиферации, но при других концентрациях, описывался в цитированных выше работах [2, 4, 5].



**Рис. 3.** Сравнение количества дифференцированных (А) и пролиферирующих (Б) клеток в относительных единицах при культивировании в контрольной среде и средах, содержащих мелатонин в концентрациях  $10^{-6}$  –  $10^{-5}M$ .

На рис.3 приведены количества дифференцированных и пролиферирующих клеток при культивировании в контрольной среде и средах, содержащих мелатонин в концентрациях  $10^{-6}$  –  $10^{-5}M$ , в относительных единицах. Как видно из графиков (рис.2) и диаграмм (рис.3), наибольшие изменения происходят в культуре, выращенной в среде с мелатонином в концентрации  $10^{-5}M$  на 3-и сутки культивирования (в частности, в культуре значительно снижается, по сравнению с контролем, количество пролиферирующих клеток и активно образуются дифференцированные клетки). Эти изменения пролиферации в культуре клеток под действием мелатонина говорят о противоопухолевых свойствах данного препарата [4, 5, 6, 7, 9], которые проявляются в конкретные временные интервалы и в определённых фармакологических концентрациях.

В целом, мелатонин в концентрациях  $10^{-6}$  –  $10^{-5}M$  подавляет пролиферацию клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300) на  $27 \pm 3,7\%$ , а дифференцировка достигает максимума при действии мелатонина в концентрации  $10^{-5}M$  на 3 сутки культивирования.

### Заключение

Таким образом, мелатонин в диапазоне концентраций  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$ М вызывает изменения развития культуры нейробластомы мыши, которые проявляются в торможении пролиферации и индукции дифференцировки клеток. Действие мелатонина проявляется в изменении морфологии клеточной культуры, в изменении общего количества клеток и их распределения на пролиферирующие, дифференцированные и гибнущие. Нами впервые показано, что количество дифференцированных клеток при использовании мелатонина в концентрации  $10^{-5}$ М достигало максимума на 3-и сутки культивирования. Количество гибнущих клеток увеличивалось по мере культивирования в экспериментальных образцах к 4-м суткам, достоверно отличаясь от контроля.

Наши результаты подтверждают антипролиферативные и онкостатические свойства мелатонина и могут служить экспериментальным обоснованием для дальнейшего изучения онкопротекторного потенциала мелатонина и для разработки рекомендаций по применению мелатонина с целью профилактики злокачественных образований.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 14-04-00625*

### **Список литературы**

1. Асланиди К.Б., Мякишева С.Н. Влияние компонентов среды на время дифференцировки и продолжительность жизни клеток нейробластомы мыши N1E-115. //Биологические мембраны — 2011. Т. 28 № 3. — С. 181–190.
2. Cos S, Verduga R, Fernández-Viadero C, Megías M, Crespo D. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. //Neurosci Lett. — 1996. Vol. 216(2). — P. 113–116.
3. Cui P, Luo Z, Zhang H et al. Effect and mechanism of melatonins action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. //J Pineal Res —2006. Vol. 41. — P. 358 – 362.
4. Garcia-Santos G, Antolin I, Herrera F et al. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. //J Pineal Res. — 2006. Vol. 41. — P.130–135.
5. Hill S. M. and Blask D. E. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and the morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. //Cancer Res. —1988. Vol. 48. — P. 6121–6126.
6. Shiu SY. Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. //J Pineal Res. — 2007. Vol. 43.— P.1–9.
7. Spiegel D, Giese-Davis J. Depression and cancer: mechanisms and disease progression. // Biol Psychiatry. — 2003. Vol. 54. — P. 269–282.

8. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? // *J Pineal Res.* — 2007. Vol. 42. — P. 28–42.
9. Trubiani O, Recchioni R, Moroni F et al. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrialdependent apoptotic pathway activation. // *J Pineal Res.* — 2005. Vol. 39. — P. 425–431.
10. Xu SC, He MD, Lu YH, Li L, Zhong M, Zhang YW, Wang Y, Yu ZP, Zhou Z. Nickel exposure induces oxidative damage to mitochondrial DNA in Neuro2a cells: the neuroprotective roles of melatonin. // *J Pineal Res.* — 2011. Vol. 51. № 4. — P. 426-33.

**Рецензенты:**

Вихлянцев И.М., д.б.н., в.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино;

Тирас Н.Р., д.б.н., в.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.