

АСТАКСАНТИН МОЖЕТ ВЛИЯТЬ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КЛЕТОК МЫШИНОЙ НЕЙРОБЛАСТОМЫ N1E-115 (КЛОН C-1300)

Мякишева С.Н.¹, Бабурина Ю.Л.², Крестинина О.В.²

¹ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино;

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, e-mail: ovkres@mail.ru

В настоящем исследовании изучено действие астаксантина (АСТ) на клетки нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Показано, что АСТ приводит к снижению пролиферативной активности в клетках на 45% через 72 ч инкубации, тогда как число дифференцирующих клеток увеличивалось за этот период в 3 раза. Установлено, что АСТ способствует также снижению экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и повышению проапоптотического белка BAX. Показано, что АСТ снижает экспрессию потенциалзависимого анионного канала (VDAC1). Аналогичным образом АСТ оказывает влияние на экспрессию транслокаторного белка (TSPO). Известно, что активированная p-Akt способна регулировать рост клеток. Кроме того, p-Akt индуцирует клеточную пролиферацию и предотвращает развитие программируемой гибели клеток. АСТ не изменял соотношение p-Akt/Akt через 72 ч инкубации, тогда как в контрольных условиях, при усилении пролиферации соотношение p-Akt/Akt увеличивалось в 3 раза за аналогичный период инкубации. На основе результатов исследования сделано предположение об участии АСТ в регуляции сигнальных путей в клетках нейробластомы и о возможности его противоопухолевого применения, он может считаться перспективным агентом для предотвращения онкозаболеваний.

Ключевые слова: нейробластома N1E-115 (клон C-1300), астаксантин (АСТ), клеточная сигнализация.

ASTAXANTHIN IS ABLE TO INFLUENCE GROWTH AND DEVELOPMENT OF CELLS OF MOUSE NEUROBLASTOMA N1E-115 (CLONE C-1300)

Myakisheva S.N.¹, Baburina Y.L.², Krestinina O.V.²

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino;

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: ovkres@mail.ru

This study examined the effects of astaxanthin (AST) on cells of mouse neuroblastoma N1E-115 (clone C-1300). It was shown that AST leads to a decrease in proliferative activity in cells by 45% after 72 hours of incubation, while the number of differentiating cells increased three-fold during this period. It was found that AST also contributes to a decrease in the level of Bcl-2 (the anti-apoptotic protein) and an increase in the pro-apoptotic protein BAX. AST reduced expression of the voltage-dependent anion channel (VDAC1). Moreover, AST influenced the expression of translocation protein (TSPO). Activated p-Akt is known to be able to regulate cell growth. In addition, p-Akt induces cell proliferation and prevents the development of apoptosis. AST did not change the ratio of p-Akt/Akt after 72-hours of incubation, whereas under control conditions, with increased proliferation, the ratio of p-Akt/Akt increased three-fold during the same incubation period. Based on the results of the study, an assumption was made about the participation of AST in the regulation of signaling pathways in neuroblastoma cells and the possibility of its antitumor use and can be considered a promising agent for the prevention of cancer.

Keywords: neuroblastoma N1E-115 (clone C-1300), astaxanthin (AST), cell signaling.

Астаксантин (АСТ), называемый красным морским витамином, является провитамином каротиноидом, который содержится в красном пигменте креветок, крабов и лосося и обладает многими важными биологическими функциями, такими как антиоксидантная и противовоспалительная активность [1]. Биологическая активность АСТ выше, чем у альфа-токоферола и бета-каротина [2], поэтому этот антиоксидант представляет большой интерес для исследований. Это наблюдение относится к нейродегенерации и защите когнитивной функции, поскольку эффективность этих ферментов уменьшается с

возрастом [3]. АСТ может эффективно смягчать окислительный стресс, возникающий при различных патологических состояниях, и предотвращать вызванную окислительным стрессом митохондриальную дисфункцию [4].

Матупала и сотрудники показали, что в некоторых опухолевых клетках наблюдается высокий уровень экспрессии VDAC1, поэтому этот белок можно считать антираковой мишенью [5]. Транслокационный белок (TSPO) тесно связан с VDAC1 и считается его партнером. Было доказано, что уровень TSPO повышался в раковых клетках, клетках мозга [6] и в других органах.

Серин-треониновая протеинкиназа В (Akt) является основной мишенью для регулирования роста клеток. Активированная Akt (фосфо-Akt) перемещается в цитоплазму и ядро, где фосфорилирует, активирует или ингибирует множество мишеней для регуляции различных клеточных функций [7]. Известно, что активированная Akt способствует клеточной пролиферации и ингибирует апоптоз [8].

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы исследовать влияние АСТ на пролиферацию и индукцию дифференцировки клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300), а также оценить корреляцию изменения пролиферации с изменением уровней белков TSPO и VDAC1 под действием АСТ. Кроме того, мы изучили влияние АСТ на изменение активированной протеинкиназы В (Akt) в клеточных лизатах нейробластомы.

Материал и методы исследования. Клеточная культура нейробластомы мыши N1E115 (клон С-1300) была взята из Российской коллекции клеточных культур ИНЦ РАН, Санкт-Петербург. Клетки выращивали по методике С.В. Мякишевой, описанной в [9]. Среду DMEM без сыворотки применяли в качестве контроля. АСТ добавляли в культуральную среду через 24 ч после посева клеток. После добавления АСТ (Sigma, США) к клеткам определяли общее число клеток, число пролиферирующих, дифференцирующих и погибших клеток через 24 и 72 ч. Оценку дифференцирующего действия проводили на основе морфологического изменения клеток [9]. Для этого осуществляли подсчет клеток, образующих отростки, длина которых более чем в 2 раза превышала диаметр клеточной сомы. Морфологический анализ клеток и микрофотографии проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Ti-E (Nikon, Япония) [9].

Клеточные лизаты готовили, как описано в [9]. Супернатанты солибилизировали в 4-кратном Лэммли буфере. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу Лэммли, описанному в [9]. Перенос белков с геля на мембрану (нитроцеллюлоза, Bio-Rad, США, 0,2 мкм) осуществляли методом Вестерн-блот. Определение изменения уровня исследуемых белков проводили при помощи коммерческих антител: Bcl-2 (Santa Cruz, США), BAX (Abcam, Великобритания), VDAC1 (Novus biologicals, США), TSPO (Abcam,

Великобритания), p-Akt (Ser 437) (Cell Signalling, Нидерланды) и Akt (Cell Signalling, Нидерланды). Анти-β-тубулин (Cell Signaling, Нидерланды) использовали как контроль белковой нагрузки. Пероксидазную активность определяли хемилюминесцентными реагентами ECL (Bio-Rad, США) [9]. Количественный анализ интенсивности белковых полос проводили с помощью денситометрии (программа Image Lab, Bio Rad, США).

Результаты проведенных экспериментов представляли как среднее значение ± стандартное отклонение (±SD) после четырех повторов ($n \geq 4$). Значимость (*) – $p < 0,05$ относительно контроля (без АСТ) считали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. В настоящем исследовании было изучено влияние АСТ на изменение пролиферации в клетках нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300) и изменение уровня белков, таких как Bcl-2, BAX, VDAC1, TSPO p-Akt и Akt, в этих условиях. Сначала мы проанализировали действие различных концентраций АСТ на клетки нейробластомы. Для этого клетки обрабатывали АСТ в течение 96 ч в различных концентрациях (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} М) (рис. 1). Нами была выбрана максимальная нетоксичная концентрация АСТ, равная 1 мМ.

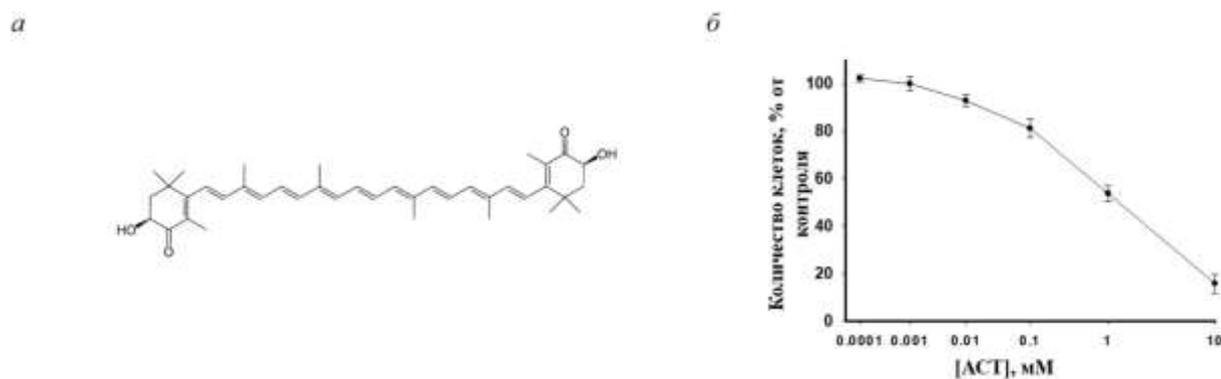


Рис. 1. а – Химическая структурная формула АСТ; б – Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов АСТ

Такая высокая доза АСТ необходима для достижения субклеточных концентраций, достаточных для оказания фармакологических эффектов. Затем мы оценили пролиферативную активность клеток нейробластомы, обработанных АСТ в течение 72 ч (рис. 2). На рисунке 2а показана влияние АСТ на морфологические изменения клеток нейробластомы после 24 и 72 ч культивирования.

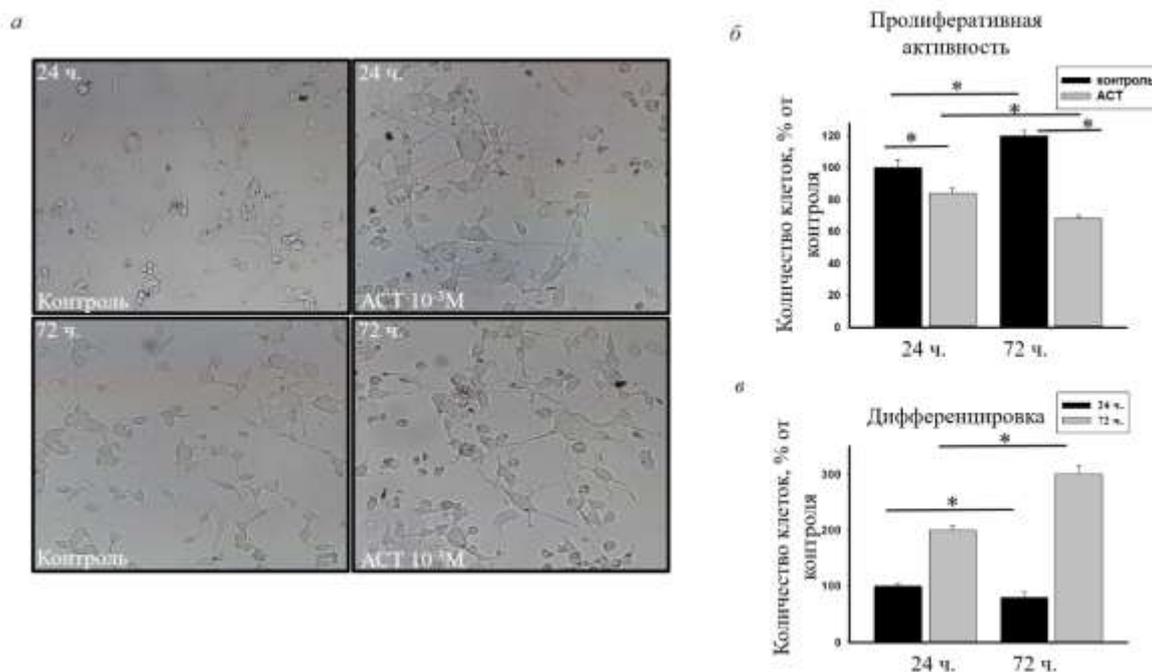


Рис. 2. а – Микрофотографии клеток после инкубации с АСТ в течение 24 (верх) и 72 ч (низ) по сравнению с контролем (без АСТ), б – диаграмма, показывающая изменение количества пролиферирующих клеток; в – изменение числа дифференцирующих клеток

Рисунок 2б отражает изменение пролиферативной активности клеток нейробластомы. Результаты изменения числа дифференцирующих клеток при добавлении в инкубационную среду АСТ показаны на рисунке 2в. Из рисунка 2в видно, что после 24 ч инкубации АСТ снижал количество пролиферирующих клеток на 20%, а через 72 ч культивирования – на 45%, тогда как количество клеток в среде, не содержащей АСТ, через 72 ч после культивирования увеличивалось на 20% по сравнению с контролем (100%, 24 ч культивирования, без АСТ). АСТ снижал пролиферативную активность клеток нейробластомы. В культурах контрольных клеток число погибших клеток не увеличивалось и составляло 1,5–2%. После 24 и 72 ч инкубации АСТ не усиливал гибель клеток, она составляла 2,5–3% (данные не показаны). Добавление АСТ усилило дифференцировку клеток в 2 раза через 24 ч культивирования по сравнению с контролем (100%, 24 ч культивирования, без АСТ), тогда как через 72 ч при добавлении АСТ число дифференцирующих клеток увеличивалось в 3 раза (рис. 2в).

Далее мы проверили изменение уровней белков семейства Bcl-2, таких как Bcl-2 и BAX, которые считаются анти- и проапоптотическими в наших экспериментальных условиях. На верхней части рисунка 3а показаны Вестерн-блоты Bcl-2 и BAX в лизированных клетках, обработанных и не обработанных АСТ в течение 24 и 72 ч культивирования.

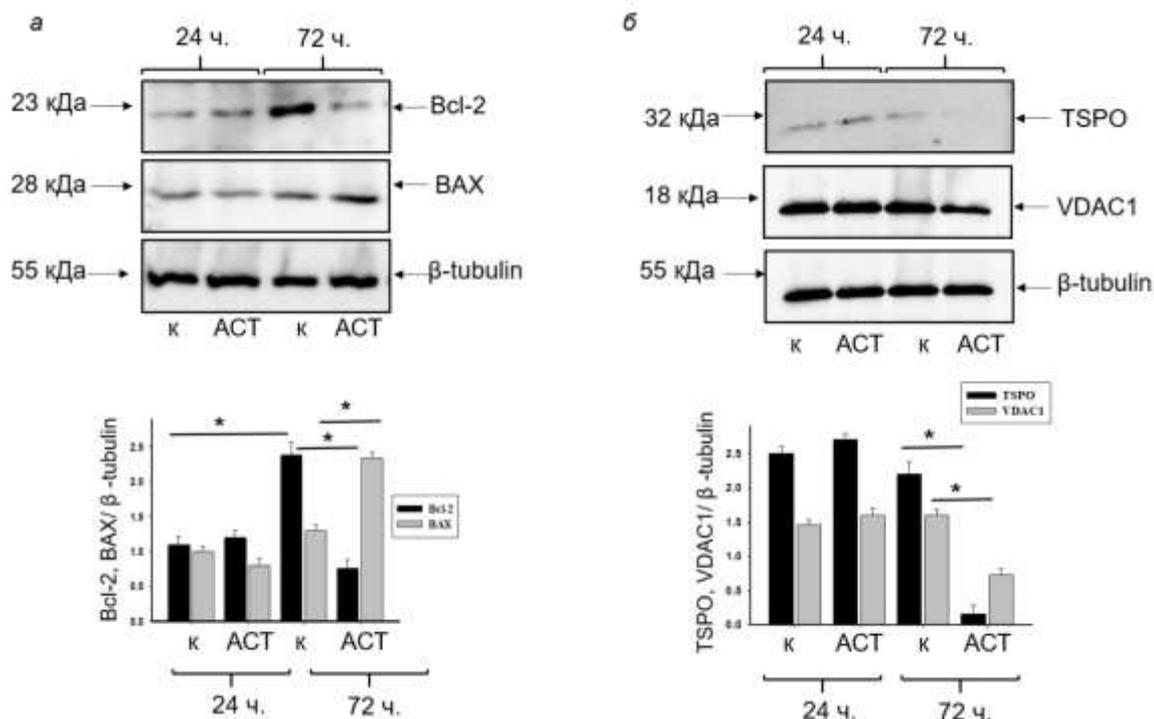


Рис. 3. Изменение уровня белков Bcl-2 и BAX, VDAC1 и TSPO в лизатах клеток нейробластомы после 24 и 72 ч культивирования в средах, содержащих АСТ, по сравнению с контролем: иммуноблоты, окрашенные соответствующими антителами (верх); диаграммы, отражающие соотношение Bcl-2 и BAX, VDAC1 и TSPO, нормированные на анти- β -тубулин (низ)

Количественное соотношение белковых полос оценивали по нормированию на анти- β -тубулин (рис. 3а нижняя панель). Через 72 ч культивирования мы наблюдали, что уровень Bcl-2 в клетках нейробластомы в контрольных условиях увеличивался в 2 раза. Содержание Bcl-2 в присутствии АСТ значимо не отличалось от контроля через 24 ч культивирования, однако через 72 ч культивирования АСТ способствовал снижению уровня Bcl-2 на ~40%. После 72 ч культивирования уровень BAX в контрольных условиях не изменялся (24 ч культивирования), однако под действием АСТ экспрессия BAX увеличивалась приблизительно в 2 раза. Полученные результаты подразумевают активацию каскада, приводящую к клеточной гибели [10].

Известно, что TSPO и его лиганды (PK11195, Ro 5-4864) считаются молекулярной мишенью при лечении онкологических заболеваний, лиганды TSPO способны проявлять антираковые свойства [9, 11] и участвуют в активации клеточной пролиферации [12]. Вероятно, изменение экспрессии TSPO влияет на туморогенность клеток. В настоящем исследовании мы наблюдали, что АСТ повышал уровень TSPO в клетках нейробластомы, что предполагает участие АСТ в развитии опухоли.

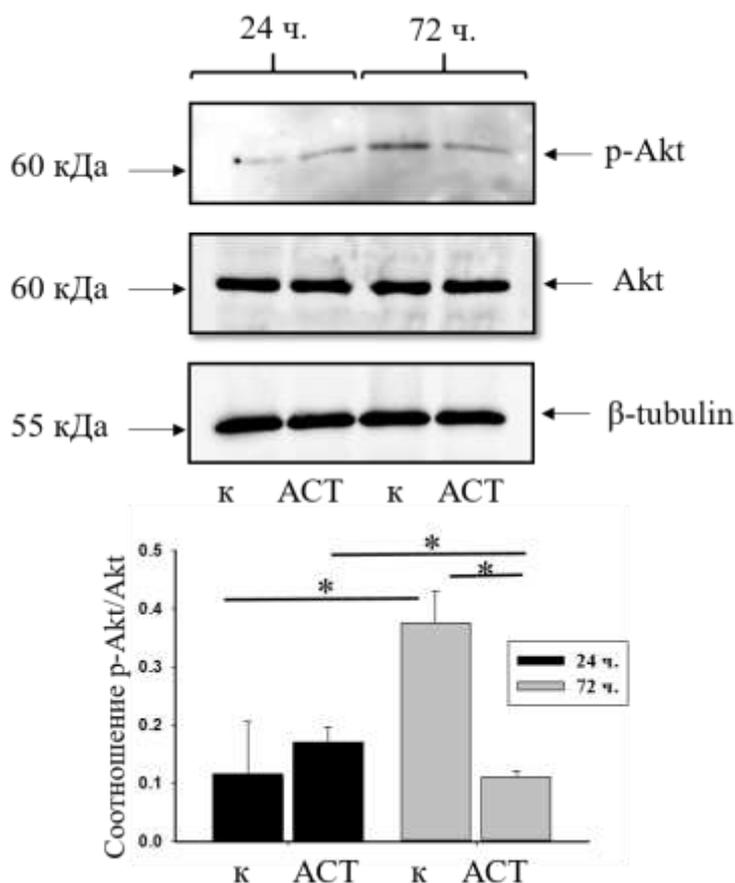


Рис. 4. Уровень фосфорилирования активированной протеинкиназы В (Akt). В верхней части показаны иммуноблоты, окрашенные антителами к p-Akt и Akt, в нижней части представлена диаграмма, отражающая изменение в соотношении p-Akt к Akt в абсолютных единицах. Анти- β -тубулин использовали как контроль белковой нагрузки

Это может привести к повышению пластических процессов, происходящих в опухолевых клетках, и к изменениям механизмов передачи сигнала через биологические мембраны [12]. Ранее мы исследовали совместное действие мелатонина с противоопухолевым препаратом, ретиноевой кислотой и наблюдали снижение уровней TSPO и VDAC1 в клетках HL-60 [12]. Молекулярные взаимодействия про- и антиапоптотических белков с VDAC являются разнообразными, более того, они могут как способствовать гибели клеток, так и предотвращать ее. Митохондриальный VDAC считается основным

компонентом, который рассматривается как мишень для противоопухолевой терапии. Было показано, что VDAC способен инициировать сигнальные каскады, приводящие к апоптозу [13], а Матупала и соавторы заключили, что VDAC1 может рассматриваться как мишень противоопухолевого действия [5]. Поэтому в настоящем исследовании мы оценили изменение уровней TSPO и VDAC1 в выбранных нами условиях (рис. 3б). На рисунке 3б показано, что в присутствии АСТ уровни TSPO, и VDAC1 снижались в 13 и 2 раза соответственно через 72 ч культивирования. Можно предположить, что АСТ способствует снижению экспрессии TSPO и VDAC1 и способен вызывать снижение онкогенности.

Известно, что Akt способна регулировать рост клеток. Кроме того, активированная Akt индуцирует клеточную пролиферацию и предотвращает развитие программируемой гибели клеток [9]. Регуляторное влияние АСТ на PI3K/Akt в настоящее время интенсивно исследуется. Ранее С.Х. Ким и Х. Ким наблюдали, что АСТ ингибировал клеточную пролиферацию и индуцировал апоптоз в клетках некоторых типов карцином, уменьшая соотношение p-Akt/Akt, тем самым подавляя нисходящие пути передачи сигналов Akt, такие как NF-κB, Wnt и STAT3 [14]. В настоящем исследовании мы проверили изменение активированной Akt в наших экспериментальных условиях. Мы заметили, что в контрольных клетках нейробластомы через 72 ч после культивирования соотношение p-Akt/Akt увеличивалось в 3 раза по сравнению с клетками нейробластомы, культивированными через 24 ч. АСТ не изменял соотношение p-Akt/Akt ни через 24, ни через 72 ч инкубации, и оно не отличалось от контрольного значения спустя сутки после культивирования. АСТ ингибировал активацию p-Akt, тем самым снижая пролиферативную активность клеток нейробластомы.

Заключение. Результаты исследований показывают, что АСТ подавляет пролиферацию клеток нейробластомы, в то же время усиливая их дифференцировку. Мы обнаружили, что АСТ способен регулировать уровни анти- и проапоптотических белков в митохондриях, что предполагает его участие в активации сигнального пути апоптоза. Также показана способность АСТ снижать экспрессию митохондриальных белков TSPO и VDAC1 в опухолевых клетках, что, вероятно, уменьшает онкогенность. АСТ ингибировал активацию p-Akt, тем самым снижая пролиферативную активность клеток нейробластомы. Таким образом, АСТ может считаться перспективным агентом при разработке новых терапевтических подходов для предотвращения онкозаболеваний.

В настоящей работе были использованы приборы ЦКП ИТЭБ РАН.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 20-04-00131, 20-015-00072.

Список литературы

1. Lee S.J., Bai S.K., Lee K.S., Namkoong S., Na H.J., Ha K.S., Han J.A., Yim S.V., Chang K., Kwon Y.G., Lee S.K., Kim Y.M. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Mol. Cells.* 2003. vol. 16. P. 97-105.
2. Ambati R.R., Phang S.M., Ravi S., Aswathanarayana R.G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Mar Drugs.* 2014. vol. 12. P. 128-152.
3. Haider S., Saleem S., Perveen T., Tabassum S., Batool Z., Sadir S., Liaquat L., Madiha S. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age (Dordr).* 2014. vol. 36. P. 9653.
4. Kim S.H., Kim H. Inhibitory Effect of Astaxanthin on Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction-A Mini-Review. *Nutrients.* 2018. vol. 10. P. 1137.
5. Mathupala S.P., Pedersen P.L. Voltage dependent anion channel-1 (VDAC-1) as an anti-cancer target. *Cancer Biol Ther.* 2010. vol. 9. P. 1053-1056.
6. Cornu P., Benavides J., Scatton B., Hauw J.J., Philippon J. Increase in omega 3 (peripheral-type benzodiazepine) binding site densities in different types of human brain tumours. A quantitative autoradiography study. *Acta Neurochir (Wien).* 1992. vol. 119. P. 146-152.
7. Okumura N., Yoshida H., Kitagishi Y., Murakami M., Nishimura Y., Matsuda S. PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. *Adv. Hematol.* 2012. vol. 2012. P. 843085.
8. Memmott R.M., Dennis P.A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal.* 2009. vol. 21. P. 656-664.
9. Крестинина О.В., Мякишева С.Н., Бабурина Ю.Л., Фадеев Р.С., Азарашвили Т.С., Акатов В.С. Влияние карбоксиамид изохинолина и мелатонина на дифференцировку клеток мышечной нейробластомы N1E-115 (клон С-1300) и на экспрессию в них транслокаторного белка TSPO и 2',3'-циклонуклеотид-3'-фосфодиэстеразы // *Нейрохимия.* 2017. № 34(1). С.41-48.
10. Guerra F., Arbinic A.A., Moro L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *BBA Bioenergetics.* 2017. vol. 1858. no. 8. P. 686-699.
11. Bhoola N.H., Mbita Z., Hull R., Dlamini Z. Translocator Protein (TSPO) as a Potential Biomarker in Human Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. vol.19. no. 8. P. 217612.

12. Krestinina O., Fadeev R., Lomovsky A., Baburina Y., Kobyakova M., Akatov V. Melatonin Can Strengthen the Effect of Retinoic Acid in HL-60 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. vol. 19. P. 2873.
13. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999. vol. 399. P. 483-487.
14. Kim S.H., Kim H. Astaxanthin Modulation of Signaling Pathways That Regulate Autophagy. *Mar Drugs.* 2019. vol. 17. P. 546.