

## ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

### ВЛИЯНИЕ ГЕМОДЕРИВАТА КРОВИ ТЕЛЯТ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, АПОПТОЗ И НЕКРОЗ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SK-N-SH

М. Г. Винокуров<sup>1</sup>, М. М. Юринская<sup>1</sup>, А. В. Князев<sup>2</sup>, Е. И. Асташкин<sup>1</sup>

Изучено влияние гемодеривата крови телят (актовегин) на выживаемость и гибель нейробластомных клеток человека линии SK-N-SH в зависимости от длительности воздействия этого препарата. Количество живых и погибших клеток в пробах определяли методом флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов Hoechst 33342 и йодида пропидия на микроскопе Keyence BZ8100, Япония. Апоптоз регистрировали по наличию фрагментации ДНК клеток. При культивировании нейробластомных клеток человека *in vitro* их количество через 48 и 72 ч возрастало на 8,5 % ( $p < 0,05$ ) и 18,4 % ( $p < 0,005$ ), соответственно. Актовегин, по сравнению с контролем, концентрационно-зависимо снижал количество живых SK-N-SH клеток и этот процесс зависел от времени его экспозиции (актовегин 1 мг/мл: через 72 ч на 23,8 %; актовегин 5 мг/мл: через 48 на 25,1 %, через 72 ч на 33,2 %,  $p < 0,05$ ). Анализ клеточной гибели показал, что в контроле и при добавлении актовегина в концентрации 0,2 мг/мл на всех этапах культивирования отмечалось увеличение процента клеток, погибших как путем апоптоза, так и некроза, в результате чего вклад апоптоза и некроза в клеточную смерть не менялся через 48 и 72 ч. При добавлении актовегина в концентрациях 1 и 5 мг/мл регистрировалось увеличение вклада некроза в клеточную гибель через 48 ч, который затем уменьшался через 72 ч и смешал соотношение в пользу апоптоза. Результаты свидетельствуют о том, что актовегин тормозит деление опухолевых клеток и способен вызывать их гибель, которая происходит как по механизму некроза, так и апоптоза, а относительный вклад этих процессов, вероятно, меняется в зависимости от времени экспозиции препарата.

**Ключевые слова:** нейробластома человека SK-N-SH; апоптоз; некроз; гемодериват крови телят.

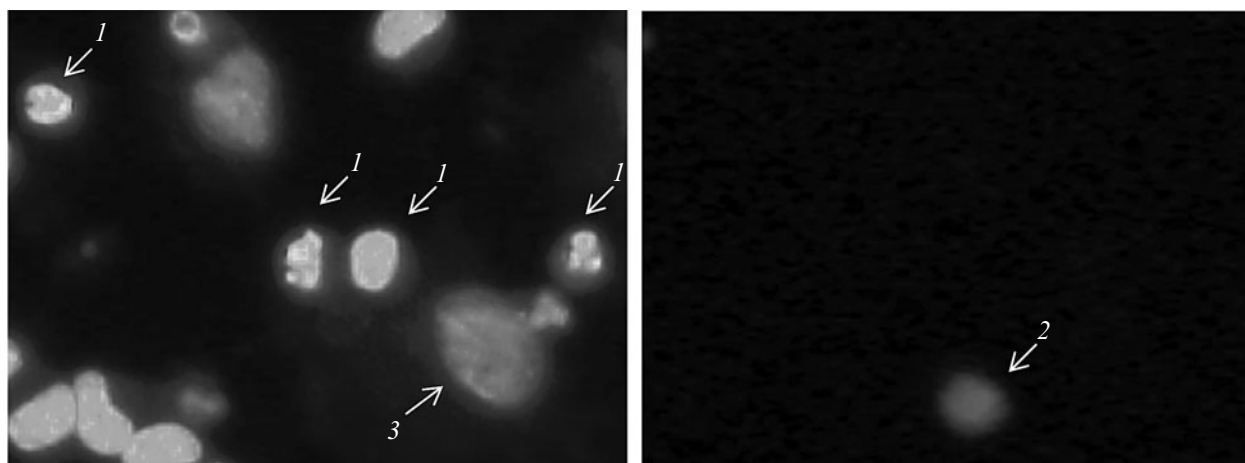
#### ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из ведущих причин потери трудоспособности и смертности во всем мире. Один из важных вопросов онкогенеза связан с выяснением влияния кислорода на скорость роста опухолевых клеток, формирование опухоли и ее малигнизацию. До последнего времени была распространена точка зрения, согласно которой кислород усиливает пролиферацию канцерогенных клеток и способствует развитию опухолей, т.е. оказывает неблагоприятное влияние на организм онкологических больных, в связи с чем надо стремиться к воздействию на опухоли гипоксией. Однако в последние годы показано, что снижение напряжения кислорода в микроокружении клеток солидных опухолей при локальной гипоксии способствует их адаптации к неблагоприятным условиям, стимулирует ангиогенез, подавляет развитие апоптоза, вызывает переключение энергетического обмена с окислительного фосфорилирования в мито-

хондриях на гликолиз, увеличивает жизнеспособность опухолевых клеток, инвазию и метастазирование [13]. В связи с этим были предприняты попытки изучить влияние увеличения уровня кислорода в тканях на формирование опухолей и их метастазирование. Один из таких подходов связан с гипербарической оксигенацией, когда пациентов помещают в барокамеры со 100 % содержанием кислорода и повышенным давлением [7]. В результате увеличения содержания кислорода в плазме крови и его диффузии по градиенту концентрации происходит его поступление в различные ткани даже в условиях низкого уровня эритроцитов и ишемии. Систематический анализ полученных результатов позволил сделать заключение о том, что гипербарическая оксигенация не увеличивает скорость деления канцерогенных клеток, а усиление доставки кислорода в опухоли не сопровождается рецидивами и метастазами [5, 14]. Более того, показано, что вследствие подобных воздействий на некоторые виды опухолей происходило торможение деления канцерогенных клеток и уменьшение размеров опухолей [4]. С другой стороны, установлено, что при стойкой гипоксии возрастает устойчивость опухолевых клеток к химио- и радиотерапии, а увеличение поступления кислорода

<sup>1</sup> Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Россия, 119991, Москва, Трубецкая ул., 8, стр. 1.

<sup>2</sup> ООО “Такеда Фармасьютикалс”, Россия, 119048, Москва, Усачева ул., 2, стр. 1.



Микроскопия клеток SK-N-SH. Клетки окрашены флуоресцентными зондами Hoechst 33342 (10 мкг/мл) и 30 мкМ пропидия йодида. 1 — апоптотные клетки, 2 — некротизированные клетки, 3 — живые клетки.

усиливает эффективность таких воздействий [15, 18]. Однако выяснилось, что при многократном использовании гипербарической оксигенации происходит образование свободных радикалов кислорода, которые оказывают цитотоксическое действие не только на опухолевые, но и здоровые клетки организма человека [8].

Другой способ увеличения уровня кислорода в клетках связан с использованием антигипоксантов — группы лекарственных препаратов, которые усиливают поступление кислорода в клетки и митохондрии. К таким препаратам относится, в том числе, депротенинизированный дериват крови телят — препарат актовегин. В состав препарата входят более 200 биоактивных компонентов с молекулярной массой до 5 кДа, среди которых аминокислоты, олигопептиды, биогенные амины и полиамины, сфинголипиды, гексозы, эйкозаноиды, лактат, сукцинат, холин, аденозин монофосфат и инозитол фосфоолигосахариды, фосфолипиды, свободные жирные кислоты, окисленные полиненасыщенные жирные кислоты и другие компоненты. В ряде экспериментальных работ показано, что актовегин увеличивает уровень кислорода в клетках, усиливает окислительное фосфорилирование и оказывает инсулиноподобное действие, стимулируя транспорт глюкозы и окисление ее метаболитов в митохондриях [9, 11]. Помимо этого, препарат обладает антиоксидантными свойствами, снижая образование свободных радикалов в изолированных нейронах и фагоцитах крови, и тормозит индуцированный апоптоз первичных культур нейронов и нейрональных опухолевых клеток человека [2, 6, 12, 20].

Остается неясным, как могут влиять антигипоксанты на рост и количество опухолевых клеток с течением времени. В связи с этим целью настоящей работы было изучение влияния актовегина на жизнеспособность клеток нейробластомы человека линии SK-N-SH, а также их гибель по механизму некроза и апоптоза во времени при культивировании *in vitro*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали культуральную среду RPMI 1640, эмбриональную сыворотку теленка (ЭТС), йодид пропидия, Hoechst 33342, HEPES, L-глутамин, пенициллин, стрептомицин, фосфатный буфер (PBS). Клетки нейробластомы человека SK-N-SH (получены из американской коллекции клеточных культур) выращивали в среде RPMI 1640 с 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 1% стрептомицина, 100 ЕД пенициллина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Перед добавлением актовегина (Такеда Фармасьютикалс, Япония) клетки собирали центрифугированием, определяли их количество и рассеивали в 4-луночные планшеты (“Nunc”) по 200 тыс. клеток на лунку в 1 мл культуральной среды с 5% ЭТС. После 24 ч инкубирования к клеткам прибавляли актовегин в конечных концентрациях в пробах 0,2, 1 и 5 мг/мл и культивировали в течение 24, 48 и 72 ч. Количество клеток в пробах определяли методом флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного зонда Hoechst 33342. Для этого после окончания культивирования клетки отмывали фосфатным буфером и окрашивали 30 мин в темноте с 10 мкг/мл Hoechst 33342 при 37 °С [16], затем добавляли йодид пропидия до конечной концентрации 30 мкМ и регистрировали флуоресценцию на инвертированном флуоресцентном микроскопе (Keyence BZ8100, Япония). Во всех экспериментах анализировали не менее 20 полей зрения, в каждом из которых находилось не менее 500 клеток. Каждая проба клеток была использована в 4 повторях. Подсчет клеток проводили с применением программы Image J v.1.49. Результаты регистрации влияния актовегина на количество клеток в экспериментальных пробах представлены в процентах, где за 100% принято количество клеток в контрольных лунках при их культивировании в течение 24 ч. Апоптоз клеток регистрировали по наличию фрагментированной ДНК (рисунок). По окончании культивирования к клеткам на 2 ч при

37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> прибавляли раствор NBT до конечной концентрации 0,1 %. Затем клетки 2 раза отмывали PBS, фиксировали метанолом и сушили. Внутриклеточный формазан растворяли в 240 мкл 2 М КОН и 280 мкл DMSO на лунку, оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 620 нм на планшетном ридере “Униплан” (Россия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программы SigmaPlot. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Межгрупповые различия оценивали по значению *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование SK-N-SH нейробластомных клеток *in vitro* сопровождалось увеличением их количества в контрольных пробах и через 48 и 72 ч было достоверно больше по сравнению с исходным уровнем (на 8,5 и на 18,4 %, соответственно). Добавление актовегина при культивировании в течение 24, 48 и 72 ч показало концентрационно-зависимый эффект препарата. Отмечено увеличение количества клеток в пробах при концентрации препарата 0,2 мг/мл через 48 и 72 ч, тогда как в концентрации 5 мг/мл наблюдали достоверное снижение количества живых опухолевых клеток через 48 и 72 ч, по сравнению с контролем (табл. 1).

Анализ количества клеток, погибших путем некроза в пробах, показал увеличение их процента в контрольной пробе через 48 и 72 ч. В пробах с добавлением актовегина наблюдали увеличение некротической гибели опухолевых клеток при культивировании клеток в течение 48 ч и снижение количества клеток, погибших по механизму некроза, при концентрациях препарата 1 и 5 мг/мл через 72 ч культивирования (табл. 2).

Таблица 1. Количество живых клеток нейробластомы человека SK-N-SH в экспериментальных пробах на разных этапах культивирования ( $M \pm SD$ )

Экспериментальная проба	Время культивирования клеток		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	100,0 ± 5,6	108,5 ± 7,6 <sup>#</sup>	118,4 ± 7,0 <sup>##</sup>
Актовегин:			
0,2 мг/мл	98,1 ± 6,1	109,4 ± 6,8	116,9 ± 8,2
1 мг/мл	95,4 ± 5,3	102,4 ± 5,8	94,6 ± 6,8*
5 мг/мл	91,6 ± 5,5	83,4 ± 5,4*	85,2 ± 6,1*

Указано количество живых клеток (%) по отношению к контрольной пробе, принятое за 100 %, через 24 ч культивирования. Количество выполненных экспериментов  $n = 8$ . В каждом эксперименте все экспериментальные пробы выполнены в 4 повторах.

Достоверность различий по сравнению с пробой через 24 ч культивирования: <sup>#</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>##</sup>  $p < 0,005$ .

Достоверность различий по сравнению с контролем в те же временные точки: \*  $p < 0,05$ .

Подсчет количества клеток, погибших путем апоптоза, показал однонаправленность этого процесса, выразившегося в увеличении процента погибших клеток, как в контрольной пробе, так и при добавлении различных концентраций актовегина, через 24, 48 и 72 ч культивирования (табл. 3).

Таким образом, анализ данных клеточной гибели показал, что при добавлении актовегина клеточная гибель происходила как по механизму некроза, так и апоптоза, однако вклад каждого процесса менялся со временем концентрационно-зависимым образом. В контроле и при добавлении актовегина в концентрации 0,2 мг/мл на всех этапах культивирования отмечали увеличение процента клеток, погибших как путем апоптоза, так и некроза, в результате чего вклад апоптоза и некроза в клеточную смерть не менялся через 48 и 72 ч. В противоположность этому при добавлении актовегина в концентрациях 1 и 5 мг/мл регистрировали увеличение вклада некроза в клеточную гибель через 48 ч, который затем уменьшался через 72 ч и смещал соотношение в пользу апоптоза (табл. 4). Полученные результаты позволяют предположить, что динамика развития некроза и апоптоза зависит от механизма действия компонентов, входящих в состав актовегина, вклад которых, вероятно, меняется со временем.

Мишенью, на которую способен влиять актовегин, может являться фактор транскрипции генов, индикатор уровня клеточного кислорода — фактор, индуцированный гипоксией (HIF-1) [17]. Под влиянием этого фактора при гипоксии увеличивается устойчивость опухолевых клеток не только к неблагоприятным условиям микроокружения, переключается энергетический обмен на аэробный гликолиз, усиливается ангиогенез, но и канцерогенные клетки становятся менее чувствительны к ускорению апоптоза [10]. Актовегин, вероятно, способен влиять на HIF-1 по 2 разным механизмам: в результате увеличения поступления кислорода, что сопровождается разрушением HIF-1α субъ-

Таблица 2. Количество клеток нейробластомы человека SK-N-SH, погибших путем некроза, на разных этапах культивирования ( $M \pm SD$ )

Экспериментальная проба	Время культивирования клеток		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	9,3 ± 0,5	13,7 ± 0,8	23,6 ± 1,5
Актовегин:			
0,2 мг/мл	8,0 ± 0,5	11,6 ± 0,7	17,4 ± 1,2*
1 мг/мл	8,0 ± 0,5	18,6 ± 1,2*	16,4 ± 1,1*
5 мг/мл	9,0 ± 0,6	16,6 ± 1,1*	13,8 ± 0,9*

Указан % погибших путем некроза клеток в экспериментальных пробах. За 100 % принимали суммарное количество всех клеток в лунках. Количество выполненных экспериментов  $n = 8$ . В каждом эксперименте все экспериментальные пробы выполнены в 4 повторах. Достоверность различий по сравнению с контролем в те же временные точки: \*  $p < 0,05$ .

Таблица 3. Количество клеток нейробластомы человека SK-N-SH, погибших путем апоптоза, на разных этапах культивирования (M ± SD)

Экспериментальная проба	Время культивирования клеток		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	8,4 ± 0,5	20,0 ± 1,5	32,2 ± 1,8
Актовегин:			
0,2 мг/мл	8,3 ± 0,6	18,0 ± 1,8	30,0 ± 1,7
1 мг/мл	7,8 ± 0,5	13,6 ± 1,4*	18,6 ± 1,8**
5 мг/мл	6,7 ± 0,6	10,0 ± 1,1**	15,6 ± 1,7**

Указан % погибших путем апоптоза клеток в экспериментальных пробах. За 100 % принимали суммарное количество всех клеток в лунке. Количество выполненных экспериментов n = 8. В каждом эксперименте все экспериментальные пробы выполнены в 4 повторах. Достоверность различий по сравнению с контролем в те же временные точки: \* p < 0,05; \*\* p < 0,005.

диницы NIF-1, образованием радикалов кислорода непосредственно в митохондриях и активацией апоптоза вследствие выхода в цитоплазму из митохондрий цитохрома C. Второй механизм связан с активацией внутриклеточных сигнальных каскадов, в которых участвует митоген-активируемая протеинкиназа — p38MAPK [1]. Этот путь активации митохондрией-зависимого эндогенного апоптоза, связанный со стимуляцией протеинкиназы p38 MAPK, как было продемонстрировано в ряде исследований, сопровождается выраженным апоптозом SK-N-SH клеток [3, 19, 21]. Ранее в нашей работе показано, что актовегин подавляет активность p38MAPK и снижает индуцированный апоптоз в SK-N-SH клетках [20]. Мы предполагаем, что активация этих 2 механизмов под влиянием актовегина происходит в разные интервалы времени, что находит свое отражение в развитии максимума апоптоза и некроза в разные сроки.

Таким образом, полученные результаты показали, что независимо от известной способности актовегина усиливать утилизацию кислорода и транспорт глюкозы в клетки, он не увеличивает количество опухолевых клеток при культивировании в данных условиях по сравнению с контролем; более того, препарат в высоких концентрациях снижает их количество. Эти результаты позволяют предположить, что актовегин не только тормозит деление опухолевых клеток, но и способен вызывать их гибель, которая происходит как по механизму некроза, так и апоптоза, а их относительный вклад, вероятно, меняется в зависимости от времени действия препарата.

## ВЫВОДЫ

1. Актовегин, по сравнению с контролем, концентрационно-зависимо снижал количество живых SK-N-SH клеток, и этот процесс зависел от времени экспозиции препарата (актовегин 1 мг/мл: через 72 ч на 23,8 %; актовегин 5 мг/мл: через 48 на 25,1 %, через 72 ч на 33,2 %, p < 0,05).

Таблица 4. Влияние актовегина на клеточную гибель SK-N-SH клеток в экспериментальных пробах при культивировании 72 ч

Экспериментальная проба	Время культивирования, ч	Суммарное количество погибших клеток в % (M ± SD)	Отношение количества погибших путем апоптоза к общему количеству погибших клеток	Отношение количества погибших путем некроза к общему количеству погибших клеток	
Контроль	24	17,7 ± 0,5	0,47	0,53	
	48	33,7 ± 1,2	0,59	0,41	
	72	55,8 ± 1,5	0,58	0,42	
Актовегин:	0,2 мг/мл	24	16,3 ± 0,6	0,51	0,49
		48	29,6 ± 1,3	0,61	0,39
		72	47,4 ± 1,2	0,63	0,37
	1 мг/мл	24	15,8 ± 0,5	0,51	0,49
		48	32,2 ± 1,3	0,42	0,58
		72	35,0 ± 1,1	0,53	0,47
	5 мг/мл	24 ч	15,7 ± 0,6	0,43	0,57
		48	26,6 ± 1,1	0,38	0,62
		72	29,0 ± 0,9	0,53	0,47

2. При анализе клеточной гибели установлено, что в контроле и при добавлении актовегина в концентрации 0,2 мг/мл на всех этапах культивирования отмечалось увеличение процента клеток, погибших как путем апоптоза, так и некроза, в результате чего вклад апоптоза и некроза в клеточную смерть не менялся через 48 и 72 ч. При добавлении актовегина в концентрациях 1 и 5 мг/мл регистрировалось увеличение вклада некроза в клеточную гибель через 48 ч, который затем уменьшался через 72 ч и смещал соотношение в пользу апоптоза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. И. Асташкин, *Pharmateca*, **9**, 20 – 27 (2016).
2. Е. И. Astashkin, M. G. Glezer, M. G. Vinokurov, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **448**(1), 57 – 60 (2013).
3. K.-Ch. Chen, L.-S. Chang, *Toxicology*, **262**(3), 199 – 206 (2009).
4. Y. C. Chen, S. Y. Chen, P. S. Ho, *Leuk Res.*, **31**(6), 805 – 815 (2007).
5. J. Daruwalla, C. Christophi, *World J. Surg.*, **30**(12), 2112 – 2131 (2006).
6. M. W. Elmlinger, M. Kriebel D. Ziegler, *Neuromolecular Med.*, **13**(4), 266 – 274 (2011).
7. A. L. Gill, C. N. Bell., *QJM*, **97**(7), 385 – 395 (2004).
8. A. Gore, M. Muralidhar, M. G. Espey, *J. Immunotoxicol.*, **7**(4), 239 – 254 (2010).
9. S. Jacob, G. J. Dietze, F. Machicao, *Drug Res*, **46**(3), 269 – 272 (1996).
10. B. Keith, R. S. Johnson, M. C. Simon, *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 9 – 22 (2012).
11. T. Kuninaka, Y. Senga, H. Senga, M. Weiner, *J. Cell Physiol*, **146**, 148 – 155 (1991).
12. F. Machicao, D. F. Muresanu, H. Hundtberger, M. Pflüger, *J. Neurol. Sci.*, **322**, 222 – 227 (2012).
13. P. Michiel, *Cell Cycle*, **8**(20), 3291 – 3296 (2009).
14. I. Moen, L. E. Stuhr, *Narcol. Oncol.*, **100**(1), 22 – 32 (2011).

15. J. Overgaard, *Radiother Oncol.*, **100**(1), 22 – 32 (2011).
16. Y. Peng, Y. Hu, N. Feng, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **383**(1), 91 – 99 (2011).
17. G. L. Semenza, *Cell*, **148**, 399 – 408 (2012).
18. A. M. Shannon, D. J. Bouchier-Hayes, C. M. Condrón, D. Toomey, *Cancer Treat. Rev.*, **29**(4), 297 – 307 (2003).
19. X. Wang, D. Hu, L. Zhang, *Food Chem. Toxicol.*, **63**, 119 – 127 (2014).
20. M. M. Yurinskaya, M. G. Vinokurov, E. I. Astashkin, *Vestn. Ros. Akad. Med. Nauk*, 9 – 10, 10 – 14 (2014).
21. J. Zhuang, Y. Li, Y. Chi, *Anticancer Drugs*, **27**(4), 312 – 317 (2016).

Поступила 01.03.17

## EFFECTS OF CALF BLOOD HEMODERIVATIVE ON SURVIVAL, APOPTOSIS AND NECROSIS OF HUMAN NEUROBLASTOMA SK-N-SH CELLS

M. G. Vinokurov<sup>1</sup>, M. M. Yurinskaya<sup>1</sup>, A. V. Knyazev<sup>2</sup>, and E. I. Astashkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/1, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Takeda Pharmaceuticals Co., ul. Usacheva 2/1, Moscow, 119048 Russia

We studied the effect of actovegin (calf blood haemoderivate) on the survival and death of human neuroblastoma SK-N-SH cells, depending on the duration of drug action. The numbers of survived and dead cells were determined by fluorescence microscopy on Keyence BZ8100 (Japan) instrument using Hoechst 33342 and propidium iodide fluorescent probes. Apoptosis was monitored by detecting the fragmentation of cell DNA. When cultured for 72 hours *in vitro*, the number of human neuroblastoma cells increased by 8.5% at 48 h ( $p < 0.05$ ) and by 18.4% at 72 h ( $p < 0.005$ ). Actovegin dose-dependently reduced the number of viable SK-N-SH cells as compared to control, and this effect also depended on the time of exposure (actovegin 1 mg/mL, 23.8% at 72 h; actovegin 5 mg/mL, 25.1% at 48 h and 33.2% at 72 h;  $p < 0.05$ ). Analysis of cell death showed that, in the control and with actovegin at 0.2 mg/mL, the number of cells lost from both necrosis and apoptosis increased at all time points, so that the relative contribution of necrosis and apoptosis at 48 and 72 h was the same. In contrast, on adding actovegin to 1 and 5 mg/mL, the relative contribution of necrosis to cell death increased at 48 h followed by decrease at 72 h, which changed the proportion in favor of apoptosis. The results may indicate that the drug not only inhibits the division of cancer cells, but is also capable of causing cell death via both necrosis and apoptosis, the relative contribution of these processes being probably dependent on the duration of drug action.

**Keywords:** human neuroblastoma SK-N-SH cells; apoptosis; necrosis; calf blood hemoderivative; actovegin.