УДК 576.5:577.3

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АПОПТОЗА У КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ

¹Мякишева С.Н., ²Крестинина О.В., ²Асланиди К.Б.

¹ΦΓБУ «Институт биофизики клетки PAH», Пущино, e-mail: myakisheva@mail.ru; ²ΦГБУ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики PAH», Пущино, e-mail: ovkres@mail.ru, kbaslanidi@gmail.com

Наши экспериментальные результаты и опубликованные данные свидетельствуют о том, что регуляция процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза может происходить в клетках нейробластомы под действием сублетальных концентраций широкого спектра веществ, в том числе и изменение ионного состава культуральной среды. Клеточный цикл и дифференцировка клетки контролируются циклинами и циклин-зависимыми киназами. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе дифференцировки, все еще плохо поняты. Предложена простейшая модель регуляции фермента с центрами связывания для органических субстратов и для неорганических ионов. Активность такого фермента зависит не только от наличия субстрата, но и от внутриклеточных активностей неорганических ионов. Ионный состав цитоплазмы может осуществить тонкую регулировку различных ферментных систем клетки.

Ключевые слова: культура клеток, нейробластома, пролиферация, дифференцировка, апоптоз, неорганические ионы

POSSIBLE MECHANISMS OF PROCESSES REGULATION OF PROLIFERATION, DIFFERENTIATION AND APOPTOSIS IN NEUROBLASTOMA

¹Myakisheva S.N., ²Krestinina O.V., ²Aslanidi K.B.

¹Institute of Cell Biophysics of RAS, Puschino, Moscow region, Russia, e-mail: myakisheva@mail.ru;

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, e-mail: ovkres@mail.ru, kbaslanidi@gmail.com

Our experimental results and published data indicate that the regulation of proliferation, differentiation and apoptosis can occur in neuroblastoma cells induced by sublethal concentrations of a wide variety of substances including the ionic composition of the culture medium. Cell cycle and differentiation of cells can be controlled by cyclins and cyclin-dependent kinases. However molecular mechanism that responsible for cellular differentiation is bed understanding. A simple model for the enzyme regulation with binding sites for organic substrates and for inorganic ions. This enzyme activity is dependent not only on the presence of the substrate, but also on intracellular activities of inorganic ions. Cytoplasmic ionic composition can realize fine regulation of various cells enzymatic systems.

Keywords: cell culture, neuroblastoma, proliferation, differentiation, apoptosis, inorganic ions

Нейробластома является наиболее распространенной солидной опухолью детского возраста и на нейробластому приходится до 15% всех детских смертей от рака [10]. Нейробластома представляет собой опухоль, возникающую из незрелых клеток эмбриональной симпатической нервной системы. Под действием различных факторов клетки нейробластомы могут пролиферировать, дифференцироваться или дедифференцироваться, а также погибать по механизмам некроза или апоптоза [17]. Существуют и периферические виды нейробластомы, возникающие в надпочечниках или в забрюшинных ганглиях, в кости и в костном мозге [19].

Клетки нейробластомы являются классической экспериментальной моделью для исследования механизмов пролиферации, дифференцировки и апоптоза. По данным PubMed еженедельно выходит не менее 2-х обзоров о нейробластоме, а общее количество публикаций приблизилось к 37.000, увеличиваясь ежегодно почти на 1500 штук.

Корреляция между гистологическими и генетическими признаками у клеток нейробластомы отмечалась многими исследователями и клиницистами. Развитие и патогенез эмбриональной нервной системы связан главным образом с Wnt сигнальным путём. В клетках нейробластомы ингибирование Wnt сигнализации блокирует пролиферацию и способствует дифференцировке, а гиперактивация Wnt сигнализации направляет раковые клетки к апоптозу [13]. Ранее нами было показано, что клетки мышиной нейробластомы N1E -115 проявляют чувствительность к широкому кругу биологически активных веществ [4, 5], а также к ионному составу культуральной среды [2, 3]. Однако остаётся вопрос, какие метаболические пути являются общими как для множества биологически активных веществ, так и для неорганических ионов, являющихся компонентами культуральных сред.

Целью работы является поиск мишеней, на которых совмещаются влияния многообразных экзогенных биологически активных веществ и неорганических ионов.

Морфология клеток нейробластомы мыши N1E -115

Клетки нейробластомы культивировали при 37°С в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (Fetal Bovine Serum, Flow Laboratories, Великобритания). Плотность посева в пластиковых флаконах (50 мл) составляла 104 клеток на см² при объёме среды 5 мл. Через сутки после обычного пересева среду меняли на обычную среду DMEM без сыворотки [4,5]. Исследования клеток проводили методом прижизненного наблюдения с использованием микроскопа.

ная применением этих веществ в сублетальных концентрациях, через пять суток культивирования достигала 50%. Эффект мелатонина на клетки нейробластомы зависел от концентрации в диапазоне 10⁻⁸М до 10⁻³М и приводил к торможению пролиферации и индукции дифференцировки [5, 6]. Некоторые растительные препараты также ингибируют пролиферацию и индуцируют дифференцировку [22]. Аналогичное действие на клетки нейробластомы оказывал препарат растительного происхождения, полученный из синюхи голубой *Polemonium coeruleum L*. [21].

Приведённые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что описанные морфологические изменения наблюдались при использовании сублетальных концентраций самых различных веществ, которые активируют или ингибируют различные сигнальные пути, в частности, Wnt сигнализацию или MAPK/ERK сигнальный

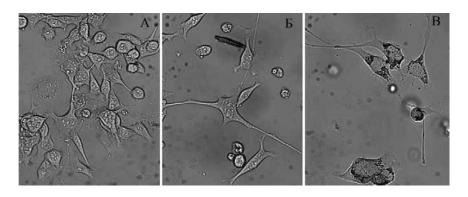


Рис. 1. Типичная морфология пролиферирующих (A), дифференцированных (Б) и погибших (В) клеток нейробластомы

Адгезированные к поверхности клетки округлой или овальной формы, с наличием коротких отростков или без отростков определяли как пролиферирующие (рис. 1А). Критерием дифференцировки клетки было увеличение размеров и появление длинных аксоноподобных отростков (рис. 1Б). Погибшие клетки определяли как клетки округлой формы или деформированные с фрагментированной структурой ядра и цитоплазмы, как правило не адгезированные к поверхности (рис. 1В).

Влияние фармакологических препаратов на клетки нейробластомы

Ранее были иисследованы процессы пролиферации и морфологической дифференцировки клеток нейробластомы под действием аверсектина С, диметилсульфоксида (ДМСО) и форсколина [4]. Доля дифференцированных клеток, обусловлен-

путь [12, 13]. Отметим, что морфология пролиферирующих, дифференцированных или погибших клеток практически не зависит от природы действующего фактора. Более того, ниже будет показано, что процесс дифференцировки сопровождается закономерным изменением ионного состава внутриклеточной среды.

Влияние неорганических ионов на клетки нейробластомы

В наших экспериментах дифференцировка клеток нейробластомы NIE-115 происходила только на бессывороточных средах. Были выявлены зависимости скорости дифференцировки клеток от осмотичности среды, концентрации ионов Na⁺, значения рH, содержания аминокислот и углеводов в культуральной среде. Показано, что быстрая дифференцировка приводит к быстрой гибели клеток, а максимальную длительность жизни дифференцированных клеток обеспечивали среды, время дифференцировки в которых было сопоставимо с длительностью клеточного цикла [2, 3]. В рамках нашей теоретической модели дифференцировка клеток нейробластомы происходила при вполне определённых значениях внутриклеточных активностей неорганических ионов Na⁺, K⁺, Ca²⁺и pH [1]. При этом неудивительно, что некоторые фармакологические препараты, непосредственно влияющие на распределение неорганических ионов между клеткой и средой, в частности, эндогенный сердечный гликозид оуабаин, действуя на Na⁺/K⁺ – ATФазу, вызывает у злокачественной нейробластомы человека обратимую остановку клеточного цикла в S-G2 фазе и увеличение содержание Na⁺ в цитоплазме, что активирует открытие Ca^{2+} -каналов и вхождение Ca^{2+} в клетку [16]. Отметим, что уже в течение первого часа инкубации культивируемых клеток с оуабаином ингибирование Na+/K+ - АТФазы приводило практически к полной деполяризации плазматической мембраны клетки [8]. В клетках нейробластомы N2A имеются два типа потенциалзависимых К+ -каналов, которые ингибируются 4-аминопиридином и тетраэтиламмонием. Ингибирование калиевых потоков в этих каналах блокирует дифференцировку, в частности, нейритогенез, вызываемый внутриклеточным цАМФ [18].

Ионы кадмия Cd²⁺ нарушают гомеостаз свободного внутриклеточного кальция Ca^{2+} , что приводит к апоптозу в различных клетках, в том числе в первичной культуре нейронов мыши. Cd²⁺ ингибирует активность Na^+/K^+ – АТФазы, Ca^{2+} – АТФазы и Mg^{2+} – $AT\Phi$ азы, нарушает транспорт Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, вызывая рост внутриклеточного Са²⁺, и активацию апоптотического сигнального пути в митохондриях [25]. Триоксид мышьяка Аѕо при концентрации порядка 0,5×10-6M также вызывает доз-зависимое ингибирование пролиферации, а при концентрациях выше $1,5 \times 10^{-6}$ М приводит к апоптозу клеток нейробластомы [11]. Известно, что мышьяк As³⁺ участвует в окислительно-восстановительных реакциях: окислительном распаде сложных углеводов, брожении, гликолизе и т. п. Возможно, что As³⁺ конкурирует с ионами Са²⁺ за соответствующие центры связывания на ферментах.

Все изменения основных параметров ионно-осмотического гомеостаза в процессе дифференцировки, которые были описаны в приведённых выше независимых экспериментах, могут быть описаны в рамках простейшей модели, учитывающей активный транспорт ионов Na⁺ и K⁺ [9].

Комплексообразование ферментов с ионами

Регуляция функциональной активности посредством комплексообразования с ионами металлов играет ключевую роль во многих ферментативных реакциях. До 40% всех, исследованных на сегодняшний день белков, являются металлопротеинами [14, 15]. Металлы играют важную роль в формировании структуры белков. Многие ферменты содержат несколько металлов в своих активных центрах, расположенных в разных местах белковой цепи. В некоторых случаях замена одного металла на другой может ингибировать ферментативную активность и стать причиной отравления и гибели организма [15]. Большинство белков ассоциируется с двухвалентными металлами: Fe²⁺ участвует в окислительно-восстановительных циклах, Zn²⁺- в каталитических реакциях, Ca²⁺ определяет стабильность структуры ферментов и играет ключевую роль в системе внутриклеточной сигнализации [14]. Существует семейство низкомолекулярных металлопротеинов, связывающих Zn²⁺, и принимающих участие в важнейших физиологических процессах у всех живых существ, в частности, в процессах канцерогенеза [14]. для функционирования биологических макромолекул необходимы и одновалентные ионы группы IA: Na⁺ и K⁺ [15].

Связывание одновалентного катиона с его аллостерическим центром влечет за собой активацию фермента и преобразование этого события в изменении каталитической активности. Ионы натрия и калия необходимы для функционирования многих ферментов, включая киназы, шапероны, фосфатазы, альдолазы, рекомбиназы, дегидрогеназы и рибокиназы, диалкилкарглициндекарбоксилазы, триптофансинтаза, тромбин и Na/ K-ATФазы [15]. Эффекты ионов Na⁺ или K⁺ для всех исследованных ферментов разнонаправлены.

Связь ферментативной активности и локальной концентрации ионов внутри клетки

Более 20 лет назад было показано, что электрофизиологические сдвиги коррелируют с изменениями синтетических процессов [20]. Как клеточный цикл, так и процесс дифференцировки контролируются циклинами и циклин-зависимыми киназами Cdks. Нарушение активности циклинов и циклинзависимых киназ приводит к развитию опухолей [24]. В зависимости от дозы некоторых препаратов в клетках задействуются различные молекулярные механизмы, в результате чего может усилиться пролиферация или произойти дифференцировка клеток, приводящая к апоптозу [23].

Связь ферментативной активности с ионно-осмотическим гомеостазом клетки наглядно проявляется в теоретической модели, учитывающей потоки субстратов и продуктов обмена через плазматическую мембрану при различных функциональных нагрузках, таких как синтез нуклеиновых кислот, синтез белков, синтез липидов или двигательная активность, требующая большого расхода АТФ. Результаты, полученные на этой модели, могут объяснить наблюдаемые в экспериментах изменения ионных проницаемостей клеточной мембраны, мембранного потенциала и внутриклеточных активностей неорганических ионов в ходе клеточного цикла и в процессе дифференцировки [1]. Отметим, что наличие доз-зависимых эффектов [23], зарегистрированных при действии многих веществ на процессы пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели, свидетельствует о вероятностном механизме взаимодействия как биологически активных веществ, так и неорганических ионов с ферментом, являющимся первичной мишенью. Такими мишенями, на которых совмещаются влияния неорганических катионов и органических субстратов, могут быть, в частности, циклинзависимые киназы или циклины [24].

Уравнение Михаэлиса – Ментен для фермента, обладающего центрами связывания как для органического субстрата, так и для неорганических ионов, имеет вид:

определяется произведением вероятностей заполнения всех *п* центров связывания фермента. При этом активность фермента зависит от внутриклеточных концентраций многих ионов, а роль ионно-осмотического гомеостаза заключается в поддержании внутриклеточных концентраций ионов на уровне, позволяющем производить тонкую регуляцию переключения различных ферментативных систем. При этом, лимитирующим фактором для активности фермента может оказаться внутриклеточная концентрация любого иона, если внутриклеточные концентрации других ионов оптимальны, т.е. вероятности заполнения соответствующих центров связывания близки к единице.

Заключение

В совокупности, представленные данные свидетельствуют о том, что морфогенез нейробластомы *in vitro* можно контролировать различными воздействиями, как биологически активными веществами, так и ионным составом культуральной среды. Все рассмотренные выше и полученные в независимых экспериментах биологические эффекты легко интерпретировать в рамках модели регуляции ферментативной активности, предполагающей совершение единичного акта при одновременном заполнении всех центров связывания для субстратов и неорганических ионов.

$$P = \left\{ \frac{[S_1]}{[S_1] + k_{1m} \left(1 + \frac{[I_1]}{k_{1i}}\right)} \right\} \left\{ \frac{[S_2]}{[S_2] + k_{2m} \left(1 + \frac{[I_2]}{k_{2i}}\right)} \right\} \dots \left\{ \frac{[S_n]}{[S_n] + k_{nm} \left(1 + \frac{[I_n]}{k_{ni}}\right)} \right\} \dots ,$$

где P – скорость ферментативной реакции; $[S_i]$ — внутриклеточная активность органического субстрата или конкретного неорганического иона; $[I_i]$ – внутриклеточная активность органического субстрата или конкретного неорганического иона, ингибирующего этот центр, k_{mi} и k_{ii} – кажущиеся константы ассоциаций органического субстрата или конкретного неорганического иона и их ингибиторов. Подобное выражение для скорости ферментативной реакции использовалось ранее для описания функционирования \hat{Na}^+/K^+ - $AT\Phi aзы$ плазматической мембраны при изменении ионного состава внешней среды и показало хорошее соответствие с результатами ряда независимых электрофизиологических экспериментов [9]. Приведённое уравнение означает, что скорость ферментативной реакции Р

Действительно, в условиях культивирования могут реализоваться две стратегии развития клеток нейробластомы. Одна стратегия заключается в ее дифференцировке и старении, и, в конечном счете, индивидуальной гибели (апоптотической или некротической). Другая может заключаться в усилении пролиферации и даже в дедифференцировке. Первый сценарий развивается на бессывороточных средах и усиливается при воздействии экзогенных или эндогенных повреждающих факторов, в частности, при воздействии сублетальных концентраций самых разнообразных веществ [4, 5, 13] или определённых изменений ионного состава культуральной среды [2, 3]. На уровне организма при достижении определённого предела компенсаторных возможностей клеток нарушается тканевой и функциональный гомеостаз в жизненно важных органах, что ведёт к старению и последующей гибели всего организма. В условиях культивирования присутствие сыворотки, в частности, наличие биологически активных вещества, способствует процессу пролиферации [3]. На уровне организма усиление пролиферации стволовых клеток приводит к развитию клона неопластических клеток, к росту опухоли и последующей гибели организма. Обе рассмотренные стратегии представляют собой многостадийные процессы, некоторые этапы которых хорошо охарактеризованы, тогда как другие нуждаются в дополнительном исследовании. В частности, наличие ключевого фермента, обладающего центрами связывания для органического субстрата и неорганических ионов можно выявить с использованием слабых магнитных полей, настроенных в резонанс с определёнными неорганическими ионами, такими как Na+, K^+ , Ca^{2+} [7].

Список литературы

- 1. Асланиди К.Б., Булгаков В.В., Замятнин А.А. (мл.), Маевский Е.И., Чайлахян Л.М. Модель метаболической регуляции мембранного электрогенеза животной клетки. // ДАН. 1998. Т.360, № 6. С. 823–828.
- 2. Асланиди К.Б., Мякишева С.Н., Иваницкий Г.Р. Ионная регуляция пролиферации клеток нейробластомы мыши NIE-115 in vitro // ДАН 2008. T. 423, № 2. C. 1 3.
- 3. Асланиди К.Б., Мякишева С.Н. Влияние компонентов среды на время дифференцировки и продолжительность жизни клеток нейробластомы мыши NIE-115. //Биологические мембраны -2011. -T. 28, № 3. -C. 181-190.
- 4. Мякишева С.Н., Костенко М.А., Дриняев В.А., Мосин В.А. Пролиферация и морфологическая дифференцировка клеток нейробластомы в культуре под влиянием авермектинов // Морфология. 2001. Т.120, № 6. С.24–26.
- 5. Мякишева С.Н., Крестинина О.В. Исследование влияния мелатонина на пролиферацию и индукцию дифференцировки клеток нейробластомы мыши N1E-115 // Современные проблемы науки и образования. 2014. N2 6.
- 6. Мякишева С.Н., Крестинина О.В., Асланиди К.Б. Мелатонин ингибирует пролиферацию и индуцирует дифференцировку клеток нейробластомы. //Сб.ст.: Труды Международной научной конференции SCVRT2013–14. Москва-Протвино 2013–2014. С. 153–156.
- 7. Тирас Х.П., Петрова О.Н., Мякишева С.Н., Попова С.С., Асланиди К.Б. Влияние слабых магнитных полей в разные фазы регенерации планарии. // Биофизика -2015. -T.60, №1. -C. 158-163.
- 8. Aslanidi K.B., Boitzova L.J., Chailakhyan L.M., Kublik L.N., Marachova I.I., Potapova T.V., Vinogradova T.A. Energetic cooperation via ion-permeable junctions in mixed cell cultures. // FEBS Letters − 1991. − Vol.283, №2. − P.295–297.
- 9. Aslanidi K.B., Panfilov A.V. The Boyle-Conway model including the effect of an electrogenic pump for nonexcitable cells // Mathematical Biosciences 1986. Vol.79. P.45–54.
- 10. Bell J.L., Malyukova A., Kavallaris M., Marshall G.M., Cheung B.B. TRIM16 inhibits neuroblastoma cell proliferation through cell cycle regulation and dynamic nuclear localization. // Cell Cycle 2013. Mar 15;12(6):889–98. doi: 10.4161/cc.23825. Epub 2013 Feb 19.

- 11. Cheung W.M., Chu P.W., Kwong Y.L. Effects of arsenic trioxide on the cellular proliferation, apoptosis and differentiation of human neuroblastoma cells // Cancer Lett. -2007. Feb 8;246(1–2):122–8. Epub 2006 Mar 29.
- 12. Chu J., Tu Y., Chen J., Tan D., Liu X., Pi R. Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells // Mol Cell Endocrinol 2016. Jan 15;420:169–79. doi: 10.1016/j. mce.2015.10.012. Epub 2015 Oct 21.
- 13. Duffy DJ, Krstic A, Schwarzl T, Halasz M, Iljin K, Fey D, Haley B, Whilde J, Haapa-Paananen S, Fey V, Fischer M, Westermann F, Henrich KO, Bannert S, Higgins DG, Kolch W. Wnt signalling is a bi-directional vulnerability of cancer cells // Oncotarget 2016. –Aug 11. doi: 10.18632/oncotarget.11203. [Epub ahead of print].
- 14. Dziegiel P., Pula B., Kobierzycki C., Stasiolek M., Podhorska-Okolow M. Metallothioneins in Normal and Cancer Cells // Adv Anat Embryol Cell Biol 2016; 218:1–117. doi: 10.1007/978–3–319–27472–0_1.
- 15. Gohara D.W., Di Cera E. Molecular Mechanisms of Enzyme Activation by Monovalent Cations. // J Biol Chem 2016. Sep. 30;291(40):20840–20848. Epub 2016 Jul 26.
- 16. Hiyoshi H, Abdelhady S, Segerström L, Sveinbjörnsson B, Nuriya M, Lundgren TK, Desfrere L. Quiescence and $\gamma H2AX$ in neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase. // Br J Cancer. 2012. May 22; 106(11):1807–15. doi: 10.1038/bjc.2012.159. Epub 2012 Apr 24.
- 17. Ikram F., Ackermann S., Kahlert Y., Volland R., Roels F., Engesser A., Hertwig F., Kocak H., Hero B., Dreidax D., Henrich K.O., Berthold F., Nürnberg P., Westermann F., Fischer M. Transcription factor activating protein 2 beta (TFAP2B) mediates noradrenergic neuronal differentiation in neuroblastoma. // Mol Oncol 2016. Feb;10(2):344–59. doi: 10.1016/j.molonc.2015.10.020. Epub 2015 Nov 7.
- 18. Leung Y.M., Huang C.F., Chao C.C., Lu D.Y., Kuo C.S., Cheng T.H., Chang L.Y., Chou C.H. Voltage-gated K+channels play a role in cAMP-stimulated neuritogenesis in mouse neuroblastoma N2A cells // J Cell Physiol 2011. Apr;226(4):1090–8. doi: 10.1002/jcp.22430.
- 19. Luksch R., Castellani M.R., Collini P., De Bernardi B., Conte M., Gambini C., Gandola L., Garaventa A, Biasoni D, Podda M, Sementa AR, Gatta G, Tonini GP. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). // Crit Rev Oncol Hematol 2016. Nov. 107:163–181. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.10.001. Epub 2016 Oct 6.
- $20.\ Morgan\ D.O.\ Principles of CDK regulation. // Nature 1995, Vol. <math display="inline">374.-P.\ 131-134.$
- 21. Narimanov A.A., Kublik L.N., Myakisheva S.N. Influence of cyanosis blue Polemonium Coeruleum L. extract on the growth of transformed cells in vitro. // Experimental Oncology –1996, Vol. 18. P. 287–289.
- 22. Naveen C.R., Gaikwad S., Agrawal-Rajput R. Berberine induces neuronal differentiation through inhibition of cancer stemness and epithelial-mesenchymal transition in neuroblastoma cells. // Phytomedicine 2016, Jun 15. –23(7). P. 736–44. doi: 10.1016/j.phymed.2016.03.013. Epub 2016 Apr 13.
- 23. Russo M., Russo G.L., Daglia M., Kasi P.D., Ravi S., Nabavi S.F., Nabavi S.M. Understanding genistein in cancer: The «good» and the «bad» effects: A review. // Food Chem 2016, Apr 1. 196:589–600. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.085. Epub 2015 Sep 26.
- 24. Santamaria D., Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. // Front Biosci -2006, Jan 1.-11.-P.1164-88.
- 25. Yuan Y., Jiang C.Y., Xu H., Sun Y., Hu F.F., Bian J.C., Liu X.Z., Gu J.H., Liu Z.P. Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway. // PLoS One 2013, May 31. 8(5):e64330. doi: 10.1371/journal.pone.0064330. Print 2013.