

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АСТАКСАНТИНА ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ С ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТОМ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ N1E-115 (КЛОН С-1300)

© 2025 г. С.Н. Мякишева*, #, Ю.Л. Бабурина**, М.И. Кобякова**,
Р.Р. Крестинин**, О.В. Крестинина**, ##

*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия
#E-mail: myakisheva@mail.ru

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия
#E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2024 г.
После доработки 31.07.2024 г.
Принята к публикации 28.08.2024 г.

На культуре нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300) изучено действие астаксантинина, диэтилдитиокарбамата и их совместное применение на пролиферацию клеток. Существуют данные об антираковом действии астаксантинина в различных типах опухолевых клеток. Диэтилдитиокарбаматы применяются в качестве дополнительных препаратов в химиотерапии. Применение комплексов нетоксичных препаратов является новой стратегией для лечения онкологических заболеваний. Нами показано, что действие диэтилдитиокарбамата и астаксантинина как по отдельности, так и при совместном применении вызывает торможение пролиферации и индукцию дифференцировки клеток нейробластомы мыши N1E-115. Анализ методом вестерн-блоттинга выявил, что сочетание действия препаратов повышало экспрессию белка СНОР (маркера эндоплазматического ретикулума) и проапоптотического белка Вах, снижало экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2, что может говорить о запуске апоптотического каскада. При этом применение отдельно диэтилдитиокарбамата вызывало снижение как уровня Вах, так и содержание Bcl-2, но не влияло на экспрессию белка СНОР. По-видимому, астаксантин модифицирует действие ДК при совместном применении.

Ключевые слова: астаксантин, диэтилдитиокарбамат натрия, пролиферация, дифференцировка, продукция активных форм кислорода, митохондриальный мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S0006302924060157, EDN: LUMPLR

В последние годы уделяется внимание защитной роли антиоксидантов в развитии организма. Одним из популярных в исследованиях является астаксантин (АСТ) – сильнейший антиоксидант, играющий важную роль в защите клеток организма от повреждений и преждевременного старения и обладающий нейропротекторным действием. Благодаря особой химической структуре АСТ обладает сильнейшими антиоксидантными свойствами. В отличие от других бета-каротиноидов и витамина Е, АСТ содержит две дополнительные группы молекул кислорода, которые наделяют

его способностью не только нейтрализовать свободные радикалы, но и останавливать разрушительные цепные реакции, ведущие к повреждению клеток. Исследованиями ряда авторов показано, что АСТ является мощным антиоксидантом – он в 10 раз эффективнее бета-каротина и в 100 раз эффективнее витамина Е [1, 2]. Благодаря своей уникальной структуре АСТ защищает мембранные клеток всех органов. Молекулы АСТ обладают способностью находиться как внутри, так и снаружи билипидной мембранны клетки, что обеспечивает дополнительную всестороннюю защиту клеток. АСТ защищает клетку и митохондриальные мембранны от окислительных повреждений, обладает нейропротекторным действием, что позволяет считать его эффективным средством при лечении нейродегенеративных за-

Сокращения: АСТ – астаксантин, ДК – дитиокарбамат натрия, АФК – активные формы кислорода, ЭР – эндоплазматический ретикулум, $\Delta\psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал.

болеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [3–5].

Широкое применение в качестве сельскохозяйственных инсектицидов, гербицидов и фунгицидов получили дитиокарбаматы (ДК). Они являются хелаторами металлов на основе серы, которые содержат дитиокарбоксильную функциональную группу, конъюгированную с алифатической вторичной аминогруппой. ДК способны оказывать как прооксидантные, так и антиоксидантные эффекты в биологических системах [6, 7]. Обнаружены нейропротекторные, antimикробные и иммуномодулирующие свойства ДК. ДК применяются в качестве спиновой ловушки нитроксидного радикала NO в онкологических исследованиях. Более того, было показано, что в клетках нейробластомы SH-SY5Y ДК снижает жизнеспособность клеток, запускает апоптоз нейронов, индуцирует митохондриальную дисфункцию и генерирует продукцию активных форм кислорода (АФК) в дозозависимой манере. ДК способны индуцировать апоптоз в клетках нейробластомы, повышая внутриклеточный уровень меди, запускающий высвобождение цитохрома *c* и активацию каспазы [6, 8]. В настоящее время ДК изучаются в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов в сочетании с другими лекарственными препаратами. Возможный синергизм или антагонизм ДК в сочетании с другими лекарственными препаратами может представлять интерес для исследования. Так, исследовано совместное действие ДК и B12b и показано, что применение этих препаратов оказывает синергическое токсическое действие на опухолевые клетки (HEp-2), вызывая выраженный стресс эндоплазматического ретикулума, обширную вакуолизацию и ингибирование апоптоза, что в конечном итоге приводит к индукции параптозоподобной гибели клеток [9].

Накопление развернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) вызывает стресс ретикулума. Для восстановления гомеостаза ЭР клетки обладают высокоспецифичной системой контроля качества ЭР, называемой ответом белка развертывания. В случае длительного стресса ЭР активируется передача сигналов апоптоза. Этот апоптоз, индуцированный стрессом ЭР, вовлечен в патогенез нескольких конформационных заболеваний. Белок СНОР индуцируется стрессом ЭР и опосредует апоптоз. Недавние исследования показали, что СНОР также участвует в продукции цитокинов, индуцированной стрессом ЭР, в макрофагах. Обсуждаются многофункциональные роли СНОР в реакции на стресс ЭР [10].

Целью настоящего исследования было изучить влияние ДК и АСТ на пролиферативную активность, изменение мембранныго потенциала и продукцию АФК, на изменение уровней белков

Bcl-2, Bax и маркера эндоплазматического ретикулума СНОР, связанных с апоптозом, в культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры и условия культивирования. Исследования проводили на культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300), полученной из Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург). Клетки нейробластомы культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) в присутствии 10% эмбриональной сыворотки (fetal bovine serum, Flow Laboratories, Великобритания) при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. В экспериментах в качестве контроля использовали среду DMEM без сыворотки и экспериментальную среду DMEM без сыворотки с добавлением диэтилдитиокарбамата Na в концентрации 10⁻⁶ М и АСТ в концентрации 10⁻⁵ М. Исследуемые препараты добавляли в культуру в логарифмической фазе роста через 24 ч после посева клеток во флаконы. Подсчет клеток проводили в девяти произвольно выбранных областях флакона. В контрольной и экспериментальной группе было не менее трех флаконов. Плотность посева в 50 мл пластиковых флаконах составляла 5.5 · 10³ клеток/см² при объеме среды 5 мл.

Оценка цитотоксического действия исследуемых препаратов на клетки нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. Клетки с плотностью 5 · 10³ клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали АСТ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10⁻⁷–10⁻⁴ М и ДК. Через 24 ч после добавления исследуемых веществ в каждую лунку добавляли резазурин (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 4 ч в условиях CO₂-инкубатора. Флуоресцентный анализ проводили на устройстве для считывания микропланшетов Infinite F200 (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны испускания 595 нм.

Измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода. Продукцию АФК измеряли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиациетата (Sigma-Aldrich, США) (Ex-485 нм/Em-530 нм). Для анализа продукции АФК в клетке (5 · 10⁵ клеток/мл) добавляли 10 мкМ 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиациетата, после чего клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 10 мин. После этого клетки однократно промывали фос-

фосфатно-солевым буфером. H_2O_2 (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. Изменение окислительной активности проводили на проточном цитометре BD Accuri C6 (Biosciences, США).

Измерение митохондриального мембранныго потенциала. Для анализа митохондриального потенциала использовали флуоресцентный краситель 3,3'-дигексилоксакарбоцианин йодид DiOC6(3) (Sigma-Aldrich, США) (Ex-482 нм/Em-501 нм). К клеточной суспензии ($5 \cdot 10^5$ клеток/мл) добавляли 10 нМ DiOC6(3) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 30 мин. После этого клетки однократно промывали в фосфатно-солевом буфере. Валиномицин (250 нМ) использовали в качестве положительного контроля. Изменение мембранныго потенциала измеряли на проточном цитометре BD Accuri C6 (Biosciences, США).

Электрофорез и вестерн-блоттинг. К клеточной суспензии добавляли выбранные количества АСТ (10^{-5} М) и ДК (10^{-6} М). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным фосфатно-солевым буфером и центрифугировали при $500 g$ в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок солюбилизовали в лизирующем буфере (RIPA) с добавлением ингибиторов протеиназ/фосфатаз, держали во льду в течение 30 мин и центрифугировали при $13000 g$ в течение 10 мин. Концентрацию белка измеряли в супернатантах по методу Брэдфорда. Полученные образцы растворяли в буфере Лэммли для образцов (Bio-Rad, США), нагревали до $95^\circ C$ в течение 3 мин. Полученные лизаты разделяли на белковые компоненты в 12.5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Затем белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) с помощью метода вестерн-блоттинга. Мембрану блокировали в растворе Roti-block (Carl Roth GmbH, Германия) при комнатной температуре в течение одного часа. Затем мембрану промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Моноклональные антитела к Bcl-2 были приобретены у компании Santa Cruz Biotechnology (США), моноклональные антитела к Bax – у компании Abcam (Великобритания), поликлональные антитела к СНОР – у компании FineTest (Китай). Белковые полосы инициировали с использованием системы обнаружения ECL (ChemiDoc Touch Imaging System, Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ и соответствующий апостериорный анализ (Стьюдента–Ньюмена–Кеулса). Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чтобы выявить цитотоксическое действие препаратов, клетки нейробластомы мыши N1E-115 культивировали в течение 24 ч с различными концентрациями АСТ (от 10^{-7} до 10^{-4} М) и ДК (от 10^{-7} до 10^{-4} М) (рис. 1). На рис. 1а показана структурная формула АСТ и диаграмма, отражающая жизнеспособность клеток нейробластомы. АСТ при концентрации 10^{-7} и 10^{-6} М не оказывал влияния на жизнеспособность клеток нейробластомы мыши. Однако, при концентрации АСТ от 10^{-5} до 10^{-4} М жизнеспособность клеток снижалась на 30 и 50% соответственно относительно контроля. Аналогичным образом мы подобрали нетоксичную концентрацию ДК (рис. 1б). Видно, что ДК при 10^{-7} М не оказывал влияния на жизнеспособность клеток нейробластомы, тогда как с увеличением концентрации от 10^{-6} до 10^{-4} М жизнеспособность клеток снижалась на 20, 30 и 50% соответственно. Поскольку жизнеспособность клеток начинала снижаться при воздействии 10^{-5} М АСТ и 10^{-6} М ДК, именно эти концентрации были использованы при дальнейшем исследовании.

На следующем этапе изучали пролиферацию клеток нейробластомы мыши N1E-115 в наших экспериментальных условиях. На рис. 2 представлены морфологические изменения при действии препаратов в течение 24 ч культивирования клеток. Как видно из рис. 2, через сутки наблюдалось торможение пролиферации и частичная гибель клеток при воздействии препаратов как по отдельности, так и при их совместном применении.

Далее исследовали влияние АСТ и ДК на изменение продукции АФК и митохондриального мембранныго потенциала $\Delta\Phi_m$ (рис. 3) в клетках нейробластомы мыши. Валиномицин (250 нМ) и H_2O_2 (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля соответственно. При обработке клеток АСТ продукция АФК повышалась на 67%, в то время как ДК не изменял этот параметр по сравнению с контролем. При совместном действии АСТ и ДК продукция АФК увеличивалась на 33% по сравнению с контролем (рис. 3а). АСТ снижал $\Delta\Phi_m$ на 41%, ДК практически не изменял этот параметр по сравнению с контролем, тогда как при совместном применении АСТ и ДК наблюдалось увеличение $\Delta\Phi_m$ на 22% (рис. 3б).

Из экспериментальных исследований известно, что АСТ и ДК способны подавлять пролиферацию, вызывать дифференцировку и активацию сигнального пути апоптоза в некоторых типах клеточных линий [8, 15, 24]. Мы проверили изменение содержания про- и антиапоптотических белков, таких как Bax и Bcl-2, в наших экспери-

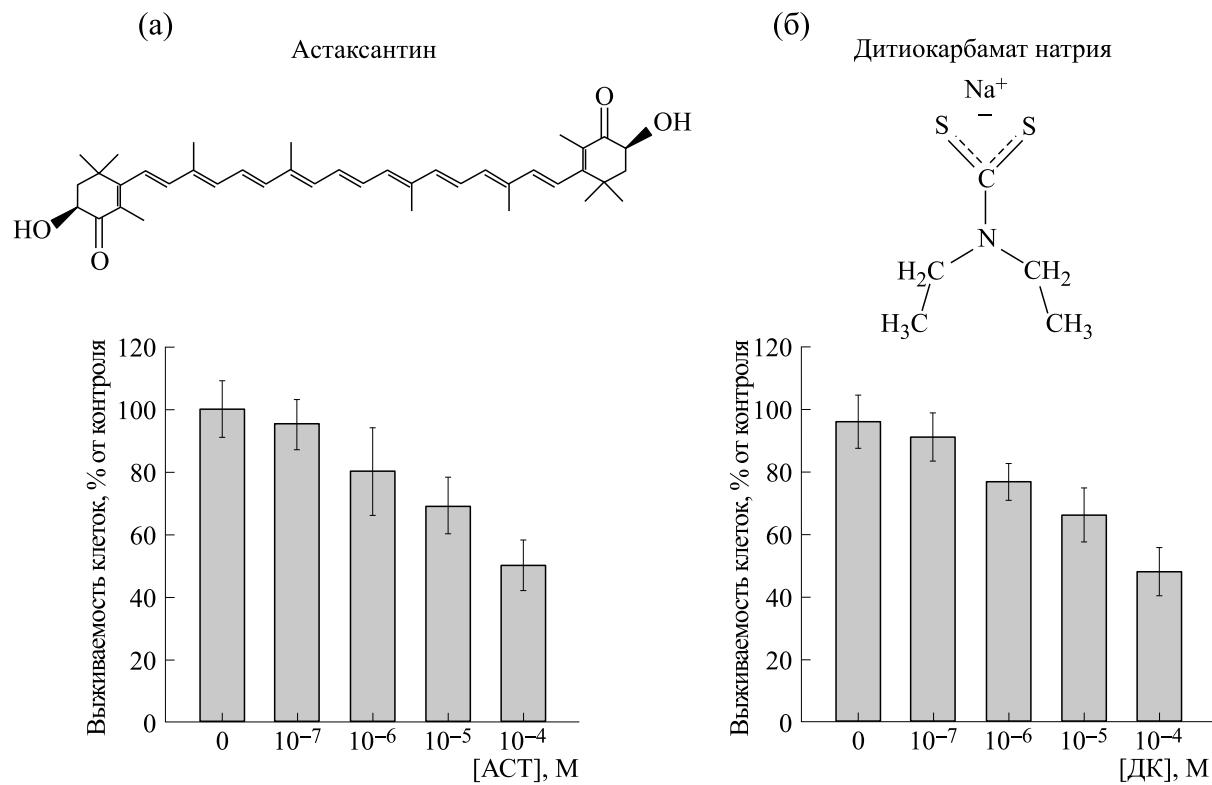


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности клеток нейробластомы мыши NIE-115 от концентрации АСТ (а) и дитиокарбамата натрия (б). Долю живых клеток определяли через 24 ч после добавления препаратов и интенсивности восстановления резазурина. Количество клеток интактной культуры (без обработки препаратами) принимали за 100%. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 6$).

ментальных условиях (рис. 4). На рис. 4 показаны вестерн-блоты, окрашенные антителами к Bax и Bcl-2. β -тубулин использовали в качестве контроля белковой нагрузки. Видно, что АСТ повышал содержание Bax и снижал содержание Bcl-2 на 40% по сравнению с контролем. В присутствии ДК уровень Bax снижался на 35%, а Bcl-2 – на 20% по сравнению с контролем. При совместном использовании препаратов уровень Bax повышался на 20%, тогда как содержание Bcl-2 уменьшалось на 40% по сравнению с контролем. Поскольку СНОР опосредует апоптоз [10], мы проанализировали изменение экспрессии этого белка в наших условиях. Как видно из рис. 4, АСТ повышал экспрессию СНОР на 20%, в то время как ДК практически не влиял на изменение уровня СНОР, однако при совместном их действии содержание СНОР увеличивалось на 40% по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная дифференцировка представляет собой процесс, в результате которого клетка становится специализированной, т. е. приобретает химические, морфологические и функциональные особенности, присущие нормальным клет-

кам данного вида. Клетки нейробластомы при определенных условиях способны дифференцироваться. При этом они демонстрируют синтез нейромедиаторов и специфических ферментов, наличие электрической и химической возбудимости поверхности мембранны [14]. В ряде работ показано, что АСТ является сильнейшим антиоксидантом, который усиливает клеточную пролиферацию и способствует дифференцировке [1, 2, 15]. В наших экспериментальных условиях мы наблюдали, что АСТ и ДК, как и их совместное применение, вызывали торможение пролиферации и индукцию клеточной дифференцировки (рис. 2).

Совместное использование препаратов, направленных на снижение/повышение пролиферативной активности представляет собой многообещающий терапевтический подход к заболеваниям различной природы. Так, недавно было установлено, что дитиокарбамат, который считается хелатором ионов тяжелых металлов [7], в комплексе с другим членом тиол-содержащего препарата может применяться в антираковой терапии [11–13]. В последние годы широко используемым в исследованиях по разработке противоопухолевых препаратов является АСТ [1–5]. В настоящем исследовании, мы изучали, способны ли

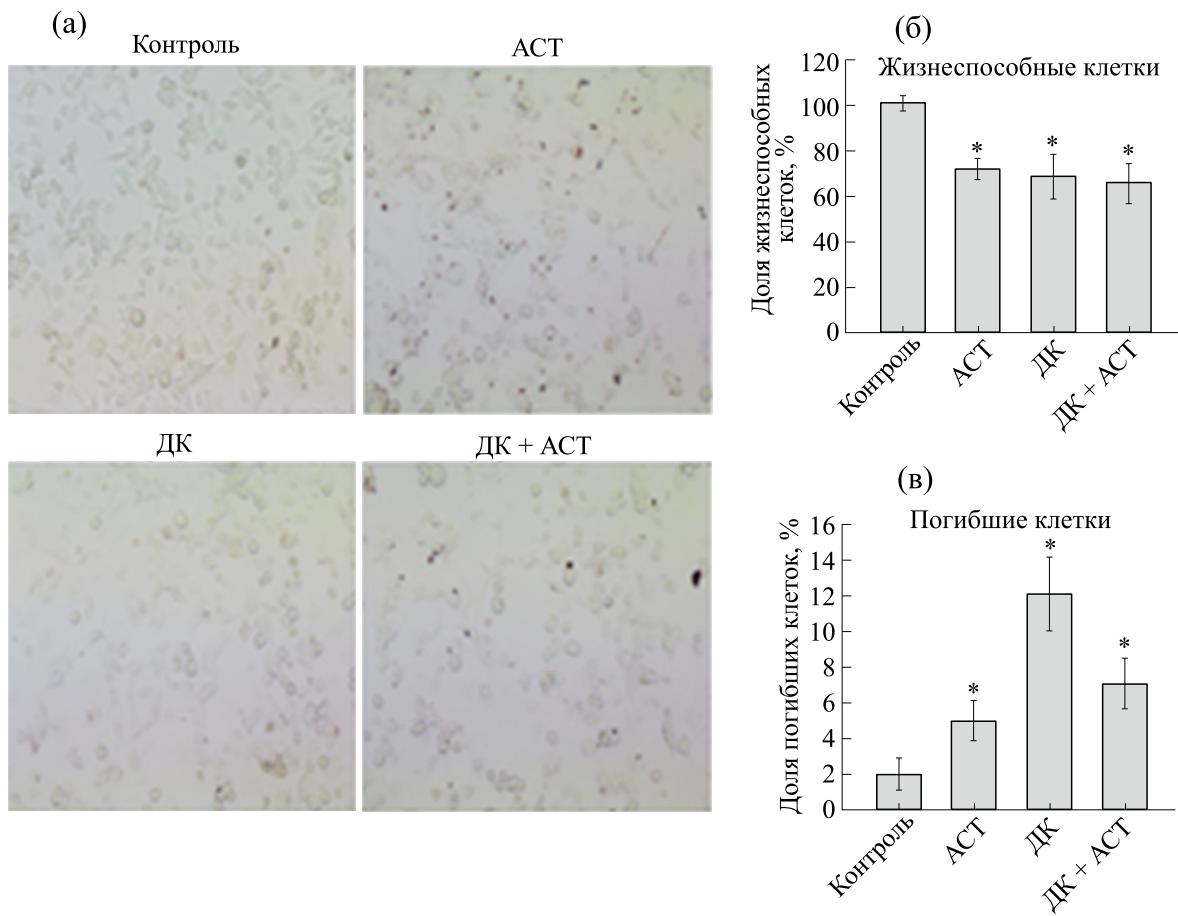


Рис. 2. Морфологический статус культуры нейробластомы мыши NIE-115 при инкубации с ACT (10^{-5} M), дитиокарбаматом натрия (10^{-6} M) и их совместным применении через 24 ч культивирования: (а) – микрофотографии клеток с исследуемыми веществами; (б) – изменение количества жизнеспособных клеток после 24 ч культивирования в средах, содержащих ACT и ДТК; (в) – изменение количества погибших клеток. Количественные изменения отображены в процентных долях относительно общего количества клеток. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 6$); * – $p < 0.05$ – достоверное различие по сравнению с контролем.

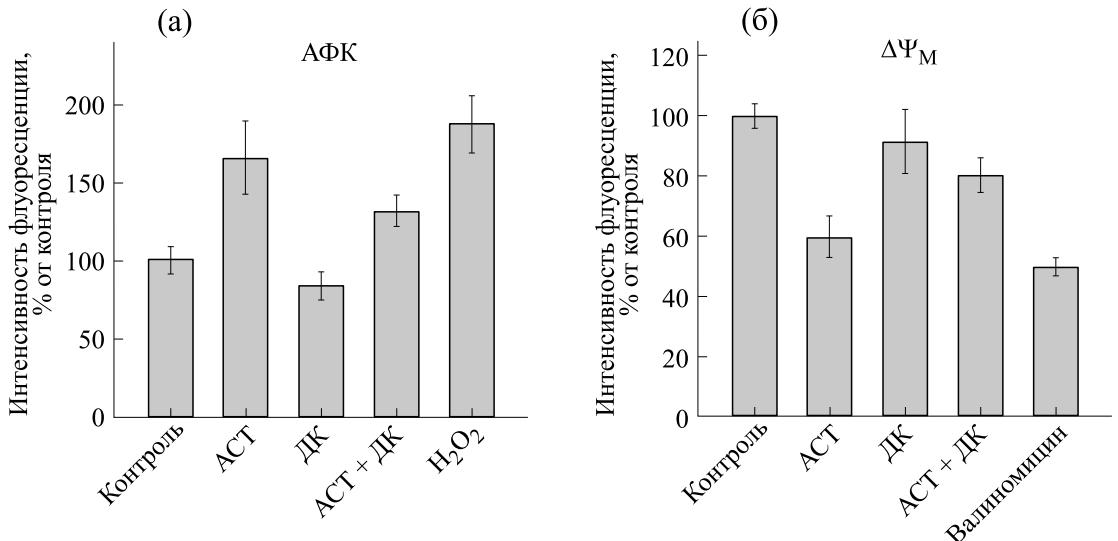


Рис. 3. Влияние ACT и ДК на изменение содержания внутриклеточной продукции АФК и митохондриального мембранный потенциала ($\Delta\Psi_M$) в клетках нейробластомы мыши NIE-115. (а) – Изменение внутриклеточной продукции АФК, H₂O₂ использовали в качестве положительного контроля; (б) – изменение $\Delta\Psi_M$, валиномицин использовали в качестве положительного контроля. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение из трех отдельных экспериментов.

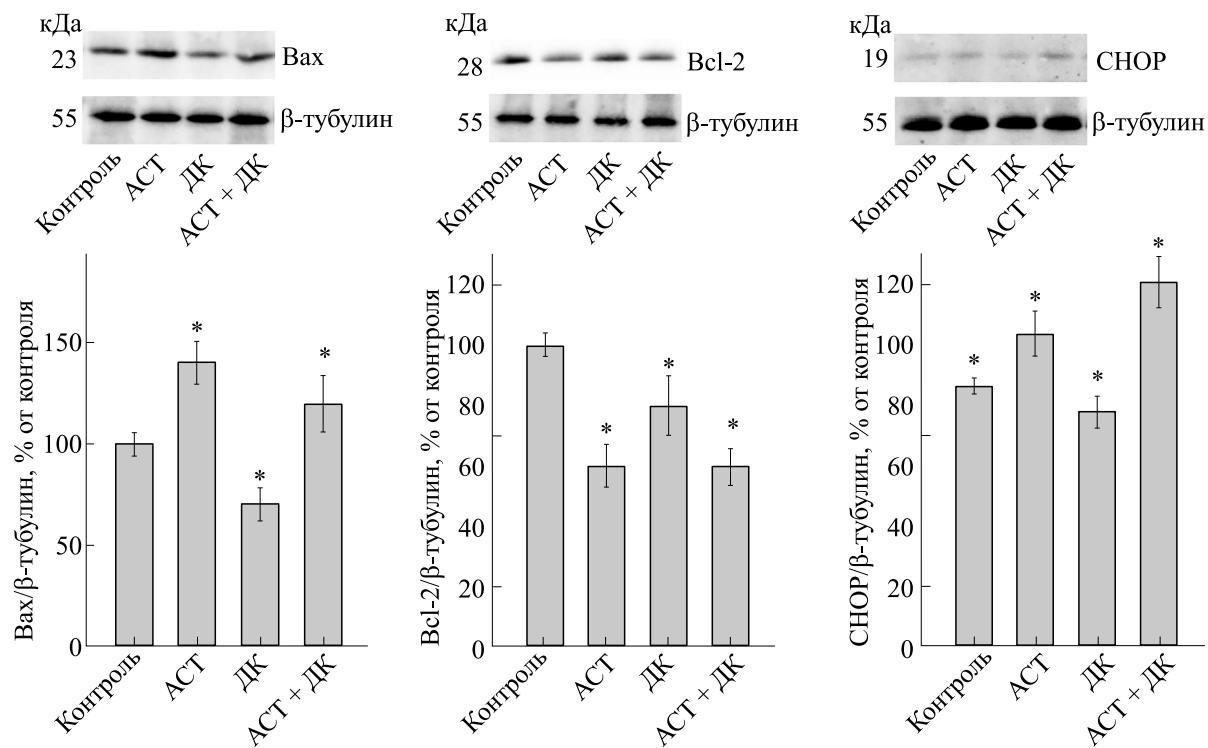


Рис. 4. Влияние ACT и DK на изменение уровней апоптотических белков в клетках нейробластомы мыши NIE-115. Иммуноокрашивание антителами к Bcl-2, Bax и CHOP. β-тубулин использовали в качестве контроля белковой нагрузки. В нижней части рисунка показаны результаты иммуноокрашивания, полученные с помощью компьютерной денситометрии, представленные как отношение оптической плотности белков к оптической плотности β-тубулина. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего ± стандартного отклонения из трех отдельных экспериментов; * – $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем.

ДК и ACT, применяемые совместно, усиливать свое действие в клетках нейробластомы мыши NIE-115 (клон C-1300). Мы наблюдали, что DK и ACT тормозили пролиферацию как по отдельности, так и совместно, причем совместное использование этих двух препаратов незначительно усиливало торможение пролиферации.

Известно, что на изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле активно реагируют различные органеллы клетки, в первую очередь митохондрии [16]. Накопление сверхпорогового Ca^{2+} в матриксе митохондрий может привести к различным нарушениям, таким как снижение мембранныго потенциала, повышение продукции АФК, и тем самым вызвать окислительный стресс [17–19]. Согласно полученным результатам, ACT значительно повышал содержание АФК по сравнению с контролем, при этом мы наблюдали снижение $\Delta\Phi_m$ относительно контроля в клетках нейробластомы. В этих же условиях в присутствии DK изменений как в содержании АФК, так и в величине $\Delta\Phi_m$ не наблюдалось. Совместное применение ACT и DK приводило к повышению продукции АФК и снижению $\Delta\Phi_m$, но при этом в 2 раза меньше, чем при использовании отдельно

ACT. По-видимому, при комбинированном применении действие ACT частично блокировалось дитиокарбаматом.

Наиболее охарактеризованное семейство белков, участвующих в регуляции апоптотической гибели клеток, состоящее из антиапоптотических и проапоптотических членов, представляет собой семейство Bcl-2 и Bax. Это белковое семейство включает как ингибиторы, так и индукторы клеточной гибели. Вместе они регулируют процессы митохондриального внутреннего апоптоза, приводящие к гибели клеток. Этот путь необходим для нормального эмбрионального развития и для предотвращения ракового перерождения [23]. Мы исследовали изменение содержание проапоптотического белка Bax и антиапоптотического белка Bcl-2. Согласно полученным результатам, ACT повышал содержание Bax и вызывал снижение Bcl-2. В случае применения DK наблюдалось снижение уровня как Bax, так и Bcl-2. При их совместном применении содержание Bax увеличивалось в меньшей степени, чем при использовании отдельно ACT, тогда как уровень Bcl-2 повышался на том же уровне, что и при отдельном ACT.

Вероятно, происходит взаимомодулирующее влияние этих двух препаратов.

Что касается изучения экспрессии белка эндоплазматического ретикулума CHOP, который непосредственно связан с апоптозом, то здесь наблюдалось усиление уровня содержания CHOP при совместном использовании препаратов ACT и ДК по сравнению с отдельным ACT и с контролем.

Таким образом, ACT и ДК способны подавлять пролиферацию, вызывать дифференцировку и активацию сигнального пути апоптоза. Это показано в изменении АФК, $\Delta\Phi_m$ и экспрессии белков, связанных с апоптозом (Bcl-2, Bax и CHOP). Совместное действие ACT и ДК не вызывало усиления эффектов, за исключением экспрессии CHOP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы изучили действие ACT, ДК и их совместное применение на пролиферацию клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Несмотря на то, что оба препарата ингибируют пролиферацию и индуцируют дифференцировку, а также изменяют содержание проапоптотического белка и снижают уровень антиапоптотического белка, что предполагает запуск апоптотического каскада, мы наблюдали, что по отдельности ACT обладает более сильным эффектом, чем при совместном применении. Мы предполагаем, что, по-видимому, происходит взаимомодифицирующее влияние этих двух препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках Государственного задания № 075-00609-24-02 и № 075-00224-24-03.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee S. J., Bai S. K., Lee K. S., Namkoohg S., Namkoong S., Na H. J., Ha K. S., Han J. A., Yim S. V., Chang K., Kwon Y. G., Lee S. K., and Kim Y. M. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I κ B kinase-dependent NF- κ B activation. *Mol. Cells*, **16**, 97–105 (2003). PMID: 14503852
- Ambati R. R., Phang S. M., Ravi S., and Aswathanarayana R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Mar. Drugs*, **12**, 128–152 (2014). DOI: 10.3390/md12010128
- Galasso C., Orefice I., Pellone P., Cirino P., Miele R., Ianora A., Brunet C., and Sansone C.. On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? *Mar. Drugs*, **16** (8), 247 (2018). DOI: 10.3390/md16080247
- Che H., Li Q., Zhang T., Wang D., Yang L., Xu J., Yanagita T., Xue C., Chang Y., and Wang Y. Effects of astaxanthin and docosahexaenoic-acid-acylated astaxanthin on Alzheimer's disease in APP/PS1 double-transgenic mice. *J. Agric. Food Chem.*, **66** (19), 4948–4957 (2018). DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00988
- Grimmig B., Kim S. H., Nash K., Bickford P. C., and Douglas Shytie R. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. *Geroscience*, **39** (1), 19–32 (2017). DOI: 10.1007/s11357-017-9958-x
- Matias A. C., Manieri T. M., Cipriano S. S., Carioni V. M., Nomura C. S., Machado C. M., and Cerchiaro G. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in neuroblastoma cells by raising the intracellular copper level, triggering cytochrome c release and caspase activation. *Toxicol. In Vitro*, **27** (1), 349–357 (2013). DOI: 10.1016/j.tiv.2012.08.017
- Nobel C. I., Kimland M., Lind B., Orrenius S., and Slater A. F. Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J. Biol. Chem.*, **270** (44), 26202–26208 (1995). DOI: 10.1074/jbc.270.44.26202
- Liu C., Liu Z., Fang Y., Liao Z., Zhang Z., Yuan X., Yu T., Yang Y., Xiong M., Zhang X., Zhang G., Meng L., and Zhang Z., Exposure to dithiocarbamate fungicide maneb *in vitro* and *in vivo*: Neuronal apoptosis and underlying mechanisms, *Environ. Int.*, **171**, 107696 (2023). DOI: 10.1016/j.envint.2022.107696
- Solovieva M., Shatalin Y., Fadeev R., Krestinina O., Baburina Y., Kruglov A., Kharechkina E., Kobyakova M., Rogachevsky V., Shishkova E., and Akatov A. V. Vitamin B12b enhances the cytotoxicity of diethyldithiocarbamate in a synergistic manner, inducing the paraptosis-like death of human larynx carcinoma cells. *Biomolecules*, **10** (1), 69 (2020). DOI: 10.3390/biom10010069
- Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.*, **151**, 217–219 (2012). DOI: 10.1093/jb/mvr143
- Solovieva M. E., Shatalin Y. V., Solovyev V. V., Sazonov A. V., Kutyshenko V. P., and Akatov V. S. Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ions. *Redox Biol.*, **20**, 28–37 (2019). DOI: 10.1016/j.redox.2018.09.016
- Ali I., Wani W. A., Saleem K., and Hseih M.-F. Design and synthesis of thalidomide based dithiocarbamate Cu(II),

- Ni(II) and Ru(III) complexes as anticancer agents. *Polyhedron*, **56** (12), 134–143 (2013). DOI: 10.1016/j.poly.2013.03.056
13. Altaf M., Monim-Ul-Mehboob M., Kawde A. N., Corona G., Larcher R., Ogasawara M., Casagrande N., Celegato M., Borghese C., Siddik Z. H., Aldinucci D., and Isab A. A. New bipyridine gold(III) dithiocarbamate-containing complexes exerted a potent anticancer activity against cisplatin-resistant cancer cells independent of p53 status. *Oncotarget*, **8** (1), 490–505 (2017). DOI: 10.18632/oncotarget.13448
14. Amano T., Richelson E., and Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69** (1), 258–263 (1972). DOI: 10.1073/pnas.69.1.258
15. Мякишева С. Н., Бабурина Ю. Л. и Крестинина О. В. Астаксантин и карбоксиамид изохинолина снижают пролиферацию клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300) и запускают пути апоптоза. *Современные проблемы науки и образования*, **5** (2022).
16. Giorgi C., Romagnoli A., Pinton P., and Rizzuto R. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.*, **8** (2), 119–130 (2008). DOI: 10.2174/156652408783769571
17. Kruman I., Guo Q., and Mattson M. P. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.*, **51** (3), 293–308 (1998). DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980201)51:3<293::AID-JNR3>3.0.CO;2-B
18. Maciel E. N., Vercesi A. E., and Castilho R. F. Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J. Neurochem.*, **79** (6), 1237–1245 (2001). DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00670.x
19. Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., and Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, **27** (50), 6407–6418 (2008). DOI: 10.1038/onc.2008.308
20. Batista A. P., da Silva T. G., Teixeira Á. A., de Medeiros P. L., Teixeira V. W., Alves L. C., and dos Santos F. A. Melatonin effect on the ultrastructure of Ehrlich ascites tumor cells, lifetime and histopathology in Swiss mice. *Life Sci.*, **93** (23), 882–888 (2013). PMID: 24383083
21. Batista A. P., da Silva T. G., Teixeira A. A., de Medeiros P. L., Teixeira V. W., Alves L. C., Dos Santos F. A., and Silva E. C. Ultrastructural aspects of melatonin cytotoxicity on Caco-2 cells *in vitro*. *Micron*, **59**, 17–23 (2014). DOI: 10.1016/j.micron.2013.12.003
22. Bejarano I., Espino J., Marchena A. M., Barriga C., Paredes S. D., Rodríguez A. B., and Pariente J. A. Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol. Cell Biochem.*, **353** (1–2), 167–176 (2011). DOI: 10.1007/s11010-011-0783-8
23. Hardwick J. M. and Soane L. Multiple functions of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5** (2), a008722 (2013). DOI: 10.1101/csdperspect.a008722
24. Мякишева С. Н., Бабурина Ю. Л., Кобякова М. И., Крестинин Р. Р., Сотникова Л. Д. и Крестинина О. В. Совместное действие мелатонина и диэтилдитиокарбамата на клетки нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). *Биофизика*, **68**, (5), 973–981 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050186

Modifying Effect of Astaxanthin in Combination with Diethyldithiocarbamate on Proliferation of Mouse Neuroblastoma Cells N1E-115 (CLONE C-1300)

S.N. Myakisheva*, Y.L. Baburina**, M.I. Kobyakova**, R.R. Krestinin**, and O.V. Krestinina**

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The effect of astaxanthin, diethyldithiocarbamate and their combined application on cell proliferation was studied on mouse neuroblastoma culture N1E-115 (clone C-1300). There is evidence for the anti-cancer effect of astaxanthin in various tumour cell types. Diethyldithiocarbamates are used as additional drugs in chemotherapy. The use of non-toxic drug complexes is a new strategy for the treatment of cancer. We have shown that the action of diethyldithiocarbamate and astaxanthin both separately and in combination causes inhibition of proliferation and induction of differentiation of mouse neuroblastoma N1E-115 cells. Based on the results of Western blot analysis it was revealed that the combination of the drugs increased the expression of CHOP protein (marker of endoplasmic reticulum) and proapoptotic protein Bax, decreased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, which may indicate the start of apoptotic cascade. Meanwhile, application of diethyldithiocarbamate alone caused a decrease in both Bax and Bcl-2 levels, but had no effect on CHOP protein expression. Apparently, astaxanthin modifies the effect of diethyldithiocarbamate when used together.

Keywords: astaxanthin, sodium diethyldithiocarbamate, proliferation, differentiation, production of reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential