

МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ ДЕЙСТВИЕ АВТ-737 В КЛЕТКАХ ОСТРОГО МОНОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА ТНР-1

© 2024 г. А. И. Ломовский^а, Ю. Л. Бабурина^а, Р. С. Фадеев^а, М. И. Кобякова^{а, б},
Я. В. Ломовская^а, Р. Р. Крестинин^а, Л. Д. Сотникова^а, О. В. Крестинина^{а, *}

^а Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пушкино,
Московская обл., 142290 Россия

^б Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Федерального
исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630117 Россия

*e-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 26.07.2023 г.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) — гормон, синтезируемый шишковидной железой. Благодаря онкостатическому действию мелатонин можно рассматривать как противоопухолевое средство и использовать в комбинированной терапии опухолей. АВТ-737, ингибитор Bcl-2, способствует гибели клеток после обработки агентами, индуцирующими проапоптотические сигналы. В настоящей работе изучено совместное действие мелатонина и АВТ-737 на изменение пролиферативной и митотической активности клеток, мембранного потенциала митохондрий, внутриклеточной продукции активных форм кислорода и цитозольного Ca^{2+} . Изучено также изменение экспрессии анти- и проапоптотических белков (Bcl-2 и Bax), маркеров аутофагии (LC3A/B (I, II) и стресса эндоплазматического ретикула (шаперонов BIP и PDI, CHOP). Совместное действие мелатонина и АВТ-737 приводило к повышению уровня цитозольного Ca^{2+} , внутриклеточной продукции активных форм кислорода и снижению мембранного потенциала митохондрий. Содержание Bcl-2 в этих условиях снижалось, в то время как уровень Bax повышался. Активация CHOP стимулировала аутофагию и приводила к снижению синтеза шаперонов BIP и PDI. Предполагается, что мелатонин способен усиливать действие других химиотерапевтических агентов и может использоваться в терапии опухолей.

Ключевые слова: острый моноцитарный лейкоз, мелатонин, АВТ-737, аутофагия, ЭПР-стресс

DOI: 10.31857/S0026898424010136, **EDN:** NWVCMU

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания признаны глобальной проблемой современной медицины, которая не имеет полноценного решения. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — гетерогенное злокачественное клональное заболевание кроветворной системы, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией незрелых, аномальных бластных клеток и нарушением продукции нормальных клеток крови [1]. Основой консервативного лечения данного заболевания является применение химиотерапевтических ДНК-тропных препаратов (цитарабина (ЦИТ), доксорубина и т.д.) [2]. В случае острого промиелоцитарного лейкоза (вариант ОМЛ с преобладанием аномальных промиелоцитов) в качестве дифференцирующей терапии используется транс-ретиноевая кислота (ATRA) [3]. Применяют также таргетную тера-

пию, направленную на различные компоненты внутриклеточных механизмов выживания опухолевых клеток. Один из препаратов таргетной терапии — АВТ-737 [4] — ингибитор Bcl_{XL}, Bcl-2 и Bcl_w, связывающийся с гидрофобной бороздкой и предотвращающий секвестрацию проапоптотических белков, таких как BAD и Bim [5].

Эффективность терапии ОМЛ снижается с увеличением возраста пациента. Это связано в первую очередь с побочным (неспецифическим) действием традиционных химиотерапевтических препаратов, в равной степени индуцирующих гибель как лейкозных бластов, так и здоровых клеток, прежде всего гемопоэтических клеток костного мозга [6]. Чтобы устранить побочное действие химиопрепаратов и повысить эффективность терапии ОМЛ необходимо уменьшить дозы противоопухолевых агентов,

применяемых в клинике, и добавить эффективные препараты, не обладающие собственной токсичностью, но повышающие эффективность низких доз основных противоопухолевых препаратов.

Одним из перспективных препаратов, применяемых в терапии ОМЛ, является гормон шишковидной железы мелатонин (МЕЛ) — N-ацетил-5-метокситриптамиин, производное биогенного амина серотонина. Амфифильные свойства МЕЛ позволяют ему легко проникать через клеточную мембрану и достигать любой клеточной структуры [7]. Исследования последних лет показали, что МЕЛ обладает онкостатической активностью в отношении опухолей разного типа. Противоопухолевую активность МЕЛ наблюдали при раке кожи [8], желудочно-кишечного тракта [9], молочной железы [10], а также при глиоме [11] и лейкозе [12]. Причем в некоторых типах опухолевых клеток МЕЛ может не только подавлять пролиферацию, но и модулировать проапоптотические сигнальные пути [13]. МЕЛ действует синергично с другими химиотерапевтическими агентами, усиливая их воздействие на лейкозные клетки. Кроме того, он способен супрессировать опухолевые клетки, не проявляя при этом токсического действия [14]. Показано, что использование МЕЛ в нетоксической концентрации совместно с низкими дозами противоопухолевых препаратов может усиливать токсическое действие этих препаратов в отношении клеток рака легкого [15], меланомы [16], плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC) [17] и толстой кишки [18], что приводит к снижению их токсического действия на здоровые клетки.

Ранее мы изучали действие как одного МЕЛ, так и в комбинации со сниженными нетоксичными концентрациями противоопухолевых препаратов разных фармакологических групп, таких как АТРА, ЦИТ и АВТ-737, на клетки MV4-11 (модель ОМЛ) и клетки HL-60 (модель ОПЛ) [19–23]. Нами показано, что в концентрации 1 мМ МЕЛ повышал цитотоксическое действие таких препаратов, как АТРА, ЦИТ, АВТ-737, что приводило к снижению количества жизнеспособных клеток, а также к снижению их пролиферативной и митотической активности. Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) считается основным процессом при различных патологических состояниях, т.е. его усиление подразумевает наличие той или иной патологии [24]. Мы наблюдали, что МЕЛ совместно с противоопухолевыми препаратами снижал содержание таких маркеров ЭПР-стресса, как иммуноглобулинсвязывающий белок ВІР и протеиндисульфидизомеразы (PDI). Это ослабляло защиту клеток ОМЛ от стресс-индуцированного апоптоза и приводило к активации такого про-

апоптотического фактора, как белок СНОР, гомологичный С/ЕВР. Известно, что ЭПР-стресс может запускать аутофагию, которая представляет собой многоэтапный процесс самодеградации клеточных компонентов, в котором белки и органеллы изолируются и модифицируются внутри аутофагосом — цитоплазматических двуслойных мембранных везикул, а затем переносятся в лизосомы [25, 26]. Показано, что окислительный стресс является инициатором и основным фактором как ЭПР-стресса, так и аутофагии [27], хотя основные механизмы, ответственные за эти события, до сих пор неизвестны.

Нами изучено влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение пролиферативной активности, мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$), цитозольного Ca^{2+} , продукцию АФК, а также изменения экспрессии маркеров ЭПР-стресса (ВІР, PDI, СНОР) и аутофагии в клетках острого моноцитарного лейкоза (ОМОЛ) ТНР-1. ОМОЛ считается одной из разновидностей ОМЛ, при которой бластные клетки в костном мозге и крови в основном представлены предшественниками моноцитов. Клеточная линия ТНР-1, выделенная из периферической крови годовалого мальчика с ОМОЛ [28], является моделью ОМОЛ и широко используется при проведении исследований, при этом клетки этой линии находятся не только в моноцитарном, но и в макрофагоподобном состоянии [29, 30].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры и условия культивирования. Линия клеток ТНР-1 (ТІВ-202), происходящая из клеток ОМОЛ человека, получена из коллекции клеточных культур АТСС (США). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640/F12 (“Sigma-Aldrich”, США), содержащей 100 мкг/мл сульфата канамицина (“ПанЭко”, Россия) и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Gibco”, США) в CO_2 -инкубаторе (37°C, влажность 95% и 5% CO_2).

Оценка цитотоксического действия исследуемых препаратов на клетки ОМОЛ. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. Клетки (плотность 5×10^3 клеток/лунку) высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали МЕЛ (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 1–10 000 мкМ и АВТ-737 (“Thermo Fisher Scientific”, США) (от 0.001 до 10 мкМ). Через 24 ч после добавления исследуемых веществ в каждую лунку вносили резазурин (“Sigma-Aldrich”) в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 4 ч в CO_2 -инкубаторе. Флуоресцентный

анализ проводили на устройстве для считывания микропланшетов Infinite F200 (“Tecan”, Швейцария) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны испускания 595 нм. Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки).

Выделение моноцитов из периферической крови человека. Моноциты получены из мононуклеарной фракции периферической крови здоровых доноров с использованием набора MojoSort Human Pan Monocyte Isolation Kit (“Biolegend”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Моноциты культивировали в среде RPMI/F12 с добавлением 10% FBS, 40 мкг/мл гентамицина в 96-луночном планшете в концентрации 5×10^3 кл/луночку в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, влажность 95%).

Анализ митотической активности клеток ТНР-1. Для определения митотической активности клетки сначала инкубировали с исследуемыми веществами в течение 24 ч, а затем центрифугировали (4 мин, 250 g), промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки окрашивали бисбензими́дом H33342 (“Sigma-Aldrich”). Митотические клетки подсчитывали, используя флуоресцентный микроскоп DM6000 (“Leica”, ФРГ). Митотический индекс рассчитывали по формуле $MI = (P + M + A + T)/N$, где $P + M + A + T$ – сумма всех клеток в фазе профазы, метафазы, анафазы и телофазы соответственно, а N – общее количество клеток.

Влияние исследуемых препаратов на жизнеспособность клеток ОМЛ. Пролиферативную активность и гибель клеток определяли с использованием красителя трипанового синего (“Sigma-Aldrich”). Культивируемые клетки центрифугировали в течение 4 мин при 250 g, а затем промывали раствором PBS. Для оценки количества и жизнеспособности клеток использовали 0.4%-ный раствор трипанового синего. Опыты проводили не менее чем в 10 повторях.

Измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода (АФК). Продукцию АФК анализировали с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA, Ex-485 нм/Em-530 нм, “Sigma-Aldrich”). Для анализа продукции АФК к клеткам (1×10^6 клеток/мл) добавляли 10 мкМ DCFH-DA, после чего инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 10 мин. После этого клетки однократно промывали в PBS. В качестве положительного контроля использовали H₂O₂ (1 мкМ). Изменение окислительной активности

определяли на проточном цитометре BD Accuri C6 (“Biosciences”).

Измерение мембранного потенциала митохондрий в клетках ТНР-1. Митохондриальный потенциал определяли с использованием флуоресцентного красителя 3,3'-дигексилосакарбонцианини́одида DiOC6(3) (“Sigma-Aldrich”) (Ex-482 нм/Em-501 нм). К суспензии клеток (10^6 клеток/мл) добавляли 10 нМ DiOC6(3) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. Клетки однократно промывали в PBS. В качестве положительного контроля использовали 0.5%-ный сапонин. Изменение мембранного потенциала оценивали с использованием проточного цитометра BD Accuri C6 (“Biosciences”).

Измерение содержания цитозольного Ca²⁺ в клетках ТНР-1. Изменение содержания цитозольного Ca²⁺ определяли с помощью флуоресцентного красителя Fluo-4 AM (“Sigma-Aldrich”) (Ex-494 нм/Em-516 нм). Для оценки изменения содержания цитозольного Ca²⁺ клетки (10^6 клеток/мл) отмывали в PBS. К клеточной суспензии добавляли Fluo-4 AM (2 мкМ) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. После окрашивания клетки дважды промывали PBS. Содержание Ca²⁺ в цитозоле измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (“Biosciences”).

Электрофорез и иммуноблот-анализ. К клеткам ТНР-1 добавляли выбранные количества МЕЛ (1000 мкМ) и АВТ-737 (2 и 7 мкМ). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным PBS. Клетки центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок солибилизировали в лизирующем буфере с добавлением ингибиторов протеиназы/фосфатазы. После встряхивания на шейкере при 4°C в течение 2 ч образцы центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка в супернатантах измеряли по методу Брэдфорда. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов Лэммли (“Bio-Rad”, США), нагревали до 95°C в течение 3 мин. Белки лигата разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (SDS) в 12.5%-ном полиакриламидном геле. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) с помощью Вестерн-блотинга (“Bio-Rad”). Мембрану блокировали в растворе Roti-block (“Carl Roth GmbH & Co.”, Германия) при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Моноклональные антитела к белку, гомологичному C/EBP (CHOP), к LC3A/B-I/II и поликлональные антитела к PDI, белку BIP, получены от “Cell Signaling”

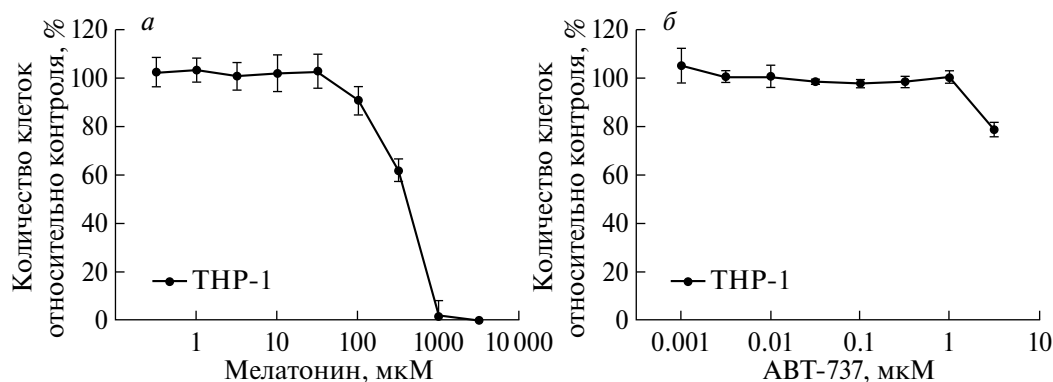


Рис. 1. Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов МЕЛ (а) и АВТ-737 (б) в клетках ТНР-1. Долю жизнеспособных клеток определяли через 24 ч после добавления веществ по интенсивности восстановления резазурина. Клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью 5×10^3 клеток на лунку и обрабатывали веществами в разных концентрациях. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$).

(США). Моноклональные антитела к Bcl-2 получены из "Santa Cruz Biotechnology" (США), моноклональные антитела к BAX были фирмы "Abcam" (Великобритания). Для нормирования использовали антитела к анти-глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH, "Cell Signaling"). Белковые полосы визуализировали с использованием системы обнаружения ECL (ChemiDoc Touch Imaging System, "Bio-Rad").

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного метода ANOVA и апостериорного анализа Стьюдента—Ньюмана—Кеулса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сначала мы проверили цитотоксический эффект МЕЛ (рис. 1а) и химиотерапевтического препарата АВТ-737 на клетках ТНР-1, служащих моделью клеток ОМЛ. Чтобы выявить цитотоксическое действие препаратов, клетки культивировали в течение 24 ч с МЕЛ в концентрации от 1 до 10 000 мкМ и АВТ-737 — от 0.001 до 10 мкМ (рис. 1). Из рис. 1а видно, что в низких концентрациях МЕЛ (до 100 мкМ) не оказывал влияния на жизнеспособность клеток ТНР-1. Однако в случае 1 мМ МЕЛ жизнеспособность клеток уменьшалась на 15% относительно контроля, а с увеличением концентрации до 10 мМ снижалась почти на 100%. Аналогичным образом мы подобрали нетоксичную концентрацию АВТ-737 (рис. 1б). Из рис. 1 видно, что АВТ-737 в концентрации до 5 мкМ не влиял на жизнеспособность клеток ТНР-1, при увеличении концентрации до 10 мкМ жизнеспособность клеток снижалась на 20%.

Для оценки жизнеспособности клеток мы выбрали концентрации АВТ-737 (2 и 7 мкМ)

и МЕЛ (1 мМ). Поскольку токсичность химиотерапевтических препаратов остается проблемой при лечении рака, мы использовали низкую концентрацию АВТ-737 в сочетании с нетоксичной концентрацией МЕЛ.

Далее мы оценили влияние АВТ-737 и МЕЛ на пролиферативную активность и гибель клеток (рис. 2а). Мы наблюдали, что АВТ-737 (7 мкМ) снижал на 20% число жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (столбец 2 vs. 1). В присутствии АВТ-737 (7 мкМ) количество погибших клеток увеличивалось в 10 раз по сравнению с контролем (столбцы 2 vs. 1). Действие АВТ-737 (2 мкМ) на жизнеспособные клетки и число погибших клеток оставались в пределах контрольных значений (столбец 3 vs. 1). Добавление МЕЛ (1 мМ) приводило к снижению числа жизнеспособных клеток на 35% относительно контроля, при этом количество погибших клеток не изменялось (столбец 4 vs. 1). Совместное действие МЕЛ и АВТ-737 в сниженной концентрации уменьшало количество жизнеспособных клеток примерно в 2 раза по сравнению с контролем и на 50% по сравнению с АВТ-737. Количество погибших клеток ТНР-1 при комбинированном действии МЕЛ с АВТ-737 увеличилось в 12 раз относительно контроля (столбец 5 vs. 1) и в 10 раз по сравнению только с АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

Известно, что МЕЛ способен снижать пролиферацию опухолевых клеток, например клеток рака молочной железы человека MCF-7 и гипофиза GH3 [31, 32], поэтому снижение числа жизнеспособных клеток в присутствии МЕЛ и при совместном применении МЕЛ и АВТ-737 в низкой концентрации может быть связано со снижением их митотической активности. На следующем этапе мы оценили влияние АВТ-737 и МЕЛ на изменение митотиче-

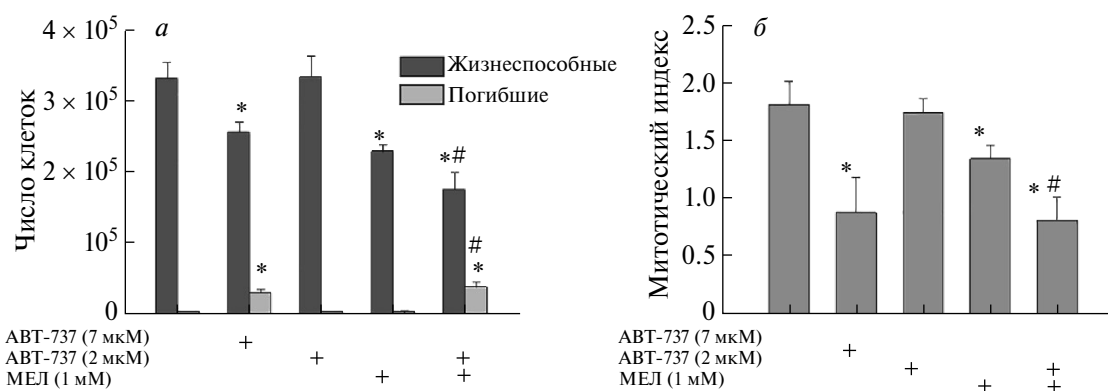


Рис. 2. Жизнеспособность и митотическая активность клеток ТНР-1 после 24 ч инкубации с МЕЛ и АВТ-737. *а* – Изменение пролиферации. *б* – Изменение митотического индекса в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Количество жизнеспособных клеток интактной культуры (контроль, без обработки препаратами) принимали равным 100%. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). * $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

ского индекса (МИ) клеток ТНР-1 (рис. 2б). АВТ-737 (7 мкМ) уменьшал МИ клеток ТНР-1 на 50% (столбец 2 vs. 1). АВТ-737 в сниженной концентрации не влиял на МИ (столбец 3 vs. 1), тогда как МЕЛ снижал МИ на 30% по сравнению с контролем (столбец 4 vs. 1). При совместном действии АВТ-737 и МЕЛ МИ уменьшался в 2 раза по сравнению с контролем (столбец 5 vs. 1) и на 60% по сравнению с одним АВТ-737 (2 мкМ) (столбец 5 vs. 3). Полученные результаты позволяют предположить, что МЕЛ способен усиливать цитотоксическое действие АВТ-737.

Известно, что МЕЛ не проявляет токсичности в здоровых клетках человека и способен повышать жизнеспособность нейтрофилов и лимфоцитов в присутствии 500 мкМ H_2O_2 [33], поэтому мы исследовали влияние только МЕЛ и МЕЛ в комбинации с АВТ-737 на жизнеспособность здоровых клеток человека – моноцитов (рис. 3). Из рис. 3 видно, что ни МЕЛ, ни комбинация МЕЛ с АВТ-737 в низкой концентрации, добавляемые к моноцитам, не приводили к изменению жизнеспособности клеток, что говорит об отсутствии цитотоксического действия как МЕЛ, так и МЕЛ в комбинации с АВТ-737 на здоровые клетки.

Известно, что повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий приводит к индукции апоптоза, и существенную роль в этом играют белки семейства Bcl-2, которые, связываясь с Вах/Вак, поддерживают целостность митохондриальной мембраны и предотвращают апоптоз [34]. В опухолевых клетках нарушена регуляция белков семейства Bcl-2, повышенное содержание этих белков приводит к тому, что клетки становятся устойчивыми к апоптозу [34]. Более того, АВТ-737 способствует гибели клеток после обработки агентами, индуцирующими проапоптотические сигналы

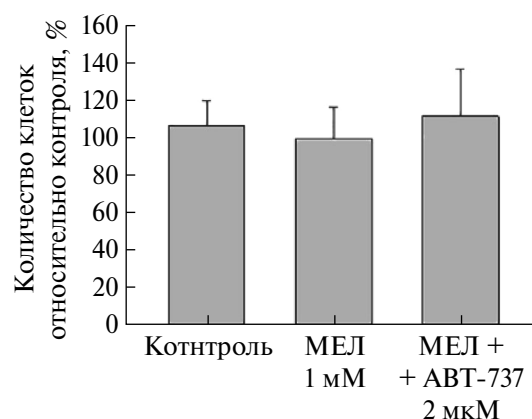


Рис. 3. Влияние МЕЛ на жизнеспособность моноцитов человека. Клетки инкубировали с МЕЛ в течение 24 ч. Количество живых клеток в интактной культуре (контроль, без обработки препаратами) принимали за 100%. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$).

[5]. В настоящем исследовании мы проверили содержание Bcl-2 и Вах в условиях нашего эксперимента (рис. 4). На рис. 4а приведены Вестерн-блоты, окрашенные антителами к Bcl-2 и Вах. GAPDH использовали для контроля белковой нагрузки. На рис. 4б, в показаны количественные изменения в содержании белков, представленные как соотношение оптической плотности белков и GAPDH. Под действием АВТ-737 (7 мкМ) содержание Bcl-2 увеличивалось на 38%, а Вах снижалось на 60% по сравнению с контролем (столбец 2 vs. 1), тогда как АВТ-737 в концентрации 2 мкМ снижал уровень Bcl-2 и Вах на 55 и 65% соответственно (столбец 3 vs. 1). МЕЛ снижал уровень Bcl-2 на 84% и повышал уровень Вах в 3.5 раза (столбец 4 vs. 1). Совместное воздействие МЕЛ и АВТ-737 (2 мкМ) приводило к снижению содержания

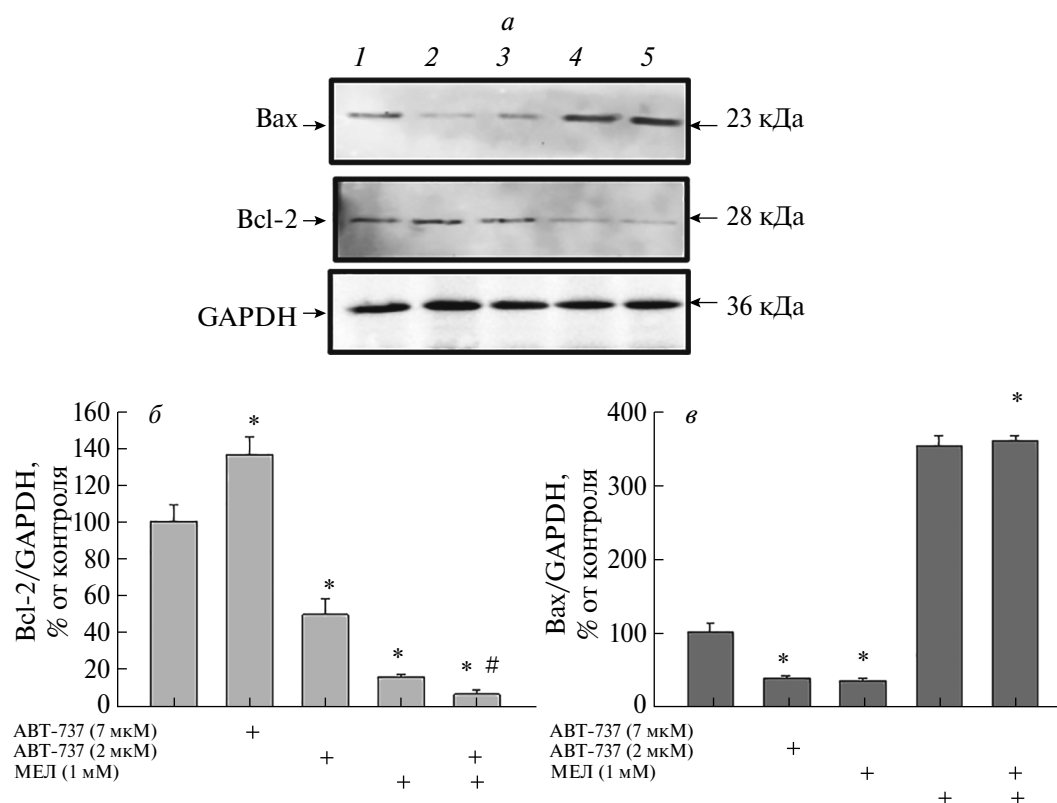


Рис. 4. Влияние МЕЛ и его комбинации с АВТ-737 на содержание белков Bcl-2 и Вах в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Иммуноокрашивание антителами к Bcl-2 и Вах. GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. *б* – Диаграмма соотношения Bcl-2/GAPDH. *в* – Диаграмма соотношения Вах/GAPDH. В качестве контроля использовали уровень белка в клеточном лизате без добавок (100%). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 4$). * $p < 0.05$ – Значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

Bcl-2 на 95% и к повышению содержания Вах в 3.5 раза (столбец 5 vs. 1). Комбинация МЕЛ и АВТ-737 (2 мкМ) снижала содержания Bcl-2 на 55% (по сравнению с действием одного МЕЛ), но содержание Вах не изменялось (столбец 5 vs. 4).

Изменение проницаемости внутренней мембраны митохондрий может приводить к формированию поры неспецифической проницаемости (мРТР) со снижением мембранного потенциала, увеличением продукции АФК и выходу Ca^{2+} в цитозоль [35]. По этой причине мы изучили влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение содержания цитозольного Ca^{2+} (рис. 5), а поскольку в освобождении Ca^{2+} участвует белок СНОР, гомологичный С/ЕВР, мы оценили также изменение содержания СНОР в клетках. При добавлении АВТ-737 (7 мкМ) к клеткам ТНР-1 содержание цитозольного Ca^{2+} (рис. 5а) в них увеличивалось на 20% (столбец 2 vs. 1). Мы не заметили каких-либо изменений в клетках ТНР-1 в присутствии АВТ-737 (2 мкМ) (столбец 3 vs. 1), обработка клеток МЕЛ также не привела к значимому эффекту (столбец 4 vs.

1). Однако при совместном добавлении АВТ-737 (2 мкМ) и МЕЛ содержание цитозольного Ca^{2+} в клетках повышалось на 12% по сравнению с контролем (столбец 5 vs. 1) и на 15% относительно одного МЕЛ (столбец 5 vs. 4). В присутствии АВТ-737 (7 и 2 мкМ) содержание СНОР в клетках ТНР-1 снижалось на 40% (столбцы 2 и 3 vs. 1), тогда как МЕЛ повышал уровень СНОР на 45% относительно контроля (столбец 4 vs. 1). Совместное действие АВТ-737 (2 мкМ) с МЕЛ приводило к увеличению содержания СНОР на 50% относительно контроля (столбец 5 vs. 1) и в 2 раза по сравнению с одним только АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

Ранее на клетках HL-60, служащих моделью ОПЛ, мы показали, что МЕЛ в комбинации с АВТ-737 в сниженной концентрации вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны, увеличивая падение мембранного потенциала, что приводит к повышению продукции АФК с последующим усилением аутофагии [21]. В настоящей работе нами изучено изменение $\Delta\psi_m$, продукции АФК и содержания таких маркеров аутофагии, как LC3A/B – I (16 кДа) и LC3A/B – II (14 кДа) в присутствии АВТ-737 и МЕЛ

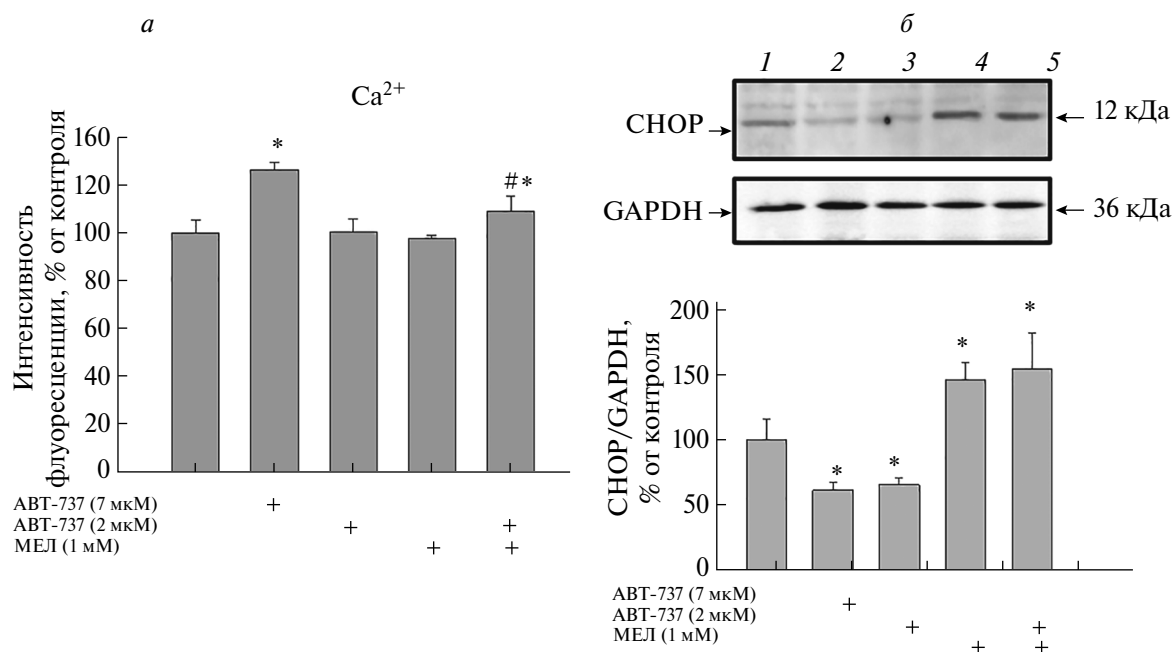


Рис. 5. Влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение цитозольного Ca²⁺ и содержания СНОР в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Изменение содержания цитозольного Ca²⁺. Интенсивность флуоресценции интактных клеток использовали в качестве контроля, данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$). *б* – Иммуноокрашивание антителами к СНОР, GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 4$). * $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с соответствующим контролем, ** $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

в клетках ТНР-1, служащих моделью ОМол (рис. 6). В качестве положительного контроля использовали 0.5%-ный сапонин. Из рис. 6 видно, что АВТ-737 (7 и 2 мкМ) не изменял $\Delta\Psi_m$ по сравнению с контролем (столбцы 3 и 4 vs. 1). Добавление МЕЛ к клеткам приводило к снижению $\Delta\Psi_m$ на 45% (столбец 5 vs. 1). Совместное действие МЕЛ и АВТ-737 приводило к снижению $\Delta\Psi_m$ на 47% относительно контроля (столбец 6 vs. 1) и на столько же относительно АВТ-737 (столбец 6 vs. 4). На рис. 6б показано изменение продукции АФК в наших условиях. H₂O₂ (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. АВТ-737 (7 и 2 мкМ) не влиял на уровень АФК по сравнению с контролем (столбцы 3 и 4 vs. 1). Добавление МЕЛ приводило к повышению продукции АФК в 7 раз (столбец 5 vs. 1), тогда как при совместном применении МЕЛ и АВТ-737 (2 мкМ) продукция АФК возрастала в 9 раз по сравнению с контролем (столбец 6 vs. 1) и в 6 раз по сравнению с АВТ-737 (столбец 6 vs. 4).

Аутофагия представляет собой многоэтапный процесс самодеградаций клеточных компонентов, при котором белки и органеллы секвестрируются и модифицируются внутри аутофагосом, а затем переносятся в лизосомы [25]. МЕЛ может регулировать аутофагию, мо-

дулируя ее активность, улучшая пути протеолиза либо предотвращая митохондриальную дисфункцию из-за снижения окислительного стресса, либо повышая эффективность ЭПР, что приводит к снижению количества неправильно свернутых белков [36]. Нами изучено изменение уровней LC3A/B (I, II) в клетках ТНР-1. GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. На рис. 6в (в верхней части) показан Вестерн-блот, окрашенный антителами LC3A/B (I, II). В нижней части рис. 6в представлены данные количественного изменения в содержании белков и соотношения белков к GAPDH. В присутствии АВТ-737 (7 и 2 мкМ) содержание LC3A/B-I в клетках ТНР-1 в обоих случаях снижалось на 70%, в то время как экспрессия LC3A/B-II возрастала на 10 и 20% соответственно (столбцы 2 и 3 vs. 1). МЕЛ повышал уровень LC3A/B-I и LC3A/B-II на 70 и 50% соответственно, по сравнению с контролем (столбец 4 vs. 1). Совместное воздействие АВТ-737 (2 мкМ) и МЕЛ приводило к увеличению содержания LC3A/B-I и LC3A/B-II в 2 раза и на 85% соответственно, относительно контроля (столбец 5 vs. 1). Обработка МЕЛ и АВТ-737 увеличивала содержание LC3A/B-I в 5 раз, а LC3A/B-II на 40% по сравнению с одним только АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

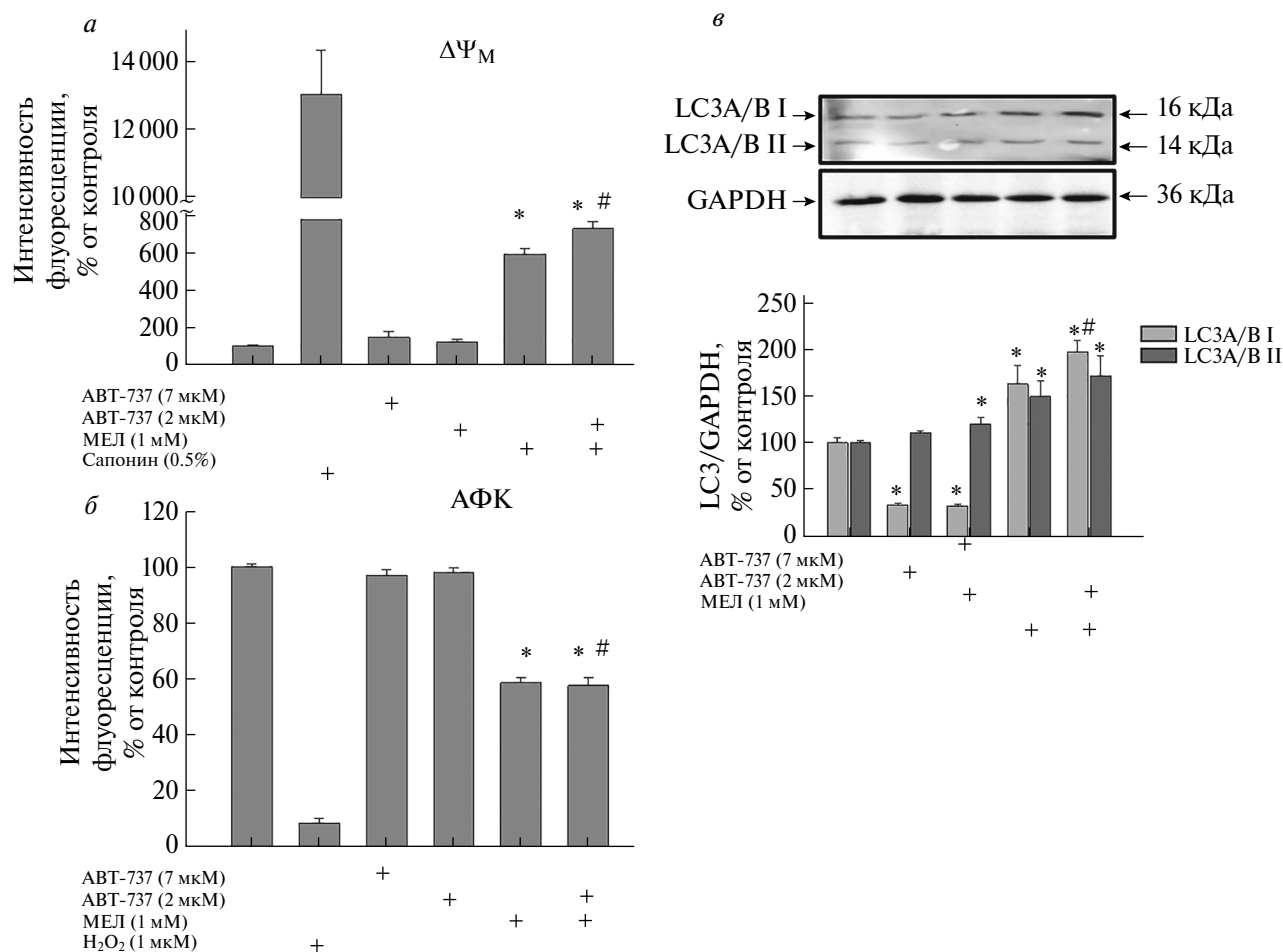


Рис. 6. Влияние МЕЛ и АВТ-737 на изменение $\Delta\Psi_M$, внутриклеточной продукции АФК и маркеров аутофагии (LC3A/B-I/II) в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* — Изменение $\Delta\Psi_M$ в клетках ТНР-1. *б* — Изменение внутриклеточной продукции АФК; данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$). *в* — Иммуноокрашивание антителами к LC3A/B-I/II, GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n = 4$). * $p < 0.05$ — значимое изменение по сравнению с соответствующим контролем, # $p < 0.05$ — значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

Поскольку ЭПР участвует в таких клеточных функциях, как кальциевый гомеостаз, синтез белков или фосфолипидов, а ЭПР-стресс способен инициировать аутофагию [37, 38], мы проверили изменение содержания белков ВІР и РDІ в наших экспериментальных условиях (рис. 7). В верхней части рис. 7 приведены Вестерн-блоты, окрашенные антителами, в нижней части — количественное изменение содержания белков, измеренное по соотношению оптической плотности белков и GAPDH. Из рис. 7 видно, что уровни ВІР и РDІ не изменялись при добавлении АВТ-737 (7 мкМ) (столбец 2 vs. 1), в то время как АВТ-737 в концентрации 2 мкМ увеличивал содержание ВІР в 2 раза, а РDІ на 25% (столбец 3 vs. 1). МЕЛ снижал содержание ВІР и РDІ на 35 и 50% соответственно (столбец 4 vs. 1). Совместное действие МЕЛ с АВТ-737 (2 мкМ) приводило к снижению уровней

ВІР и РDІ на 20 и 50% относительно контроля (столбец 5 vs. 1) и на 70% для ВІР и 60% для РDІ по сравнению с АВТ-737 (столбец 5 vs. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимосвязь между МЕЛ и онкологическими заболеваниями изучают в течение последних 80 лет. Противоопухолевая активность этого гормона подтверждается результатами многочисленных исследований. Так, показаны антипролиферативные, антимиграционные и проапоптотические эффекты МЕЛ в сочетании с 5-фторурацилом в клетках рака толстой кишки (линии SW620 и LOVO) [18]. МЕЛ ингибировал также пролиферацию опухолевых стволовых клеток, выделенных из клеток CSC рака яичников [39], подавлял рост клеток MDA-

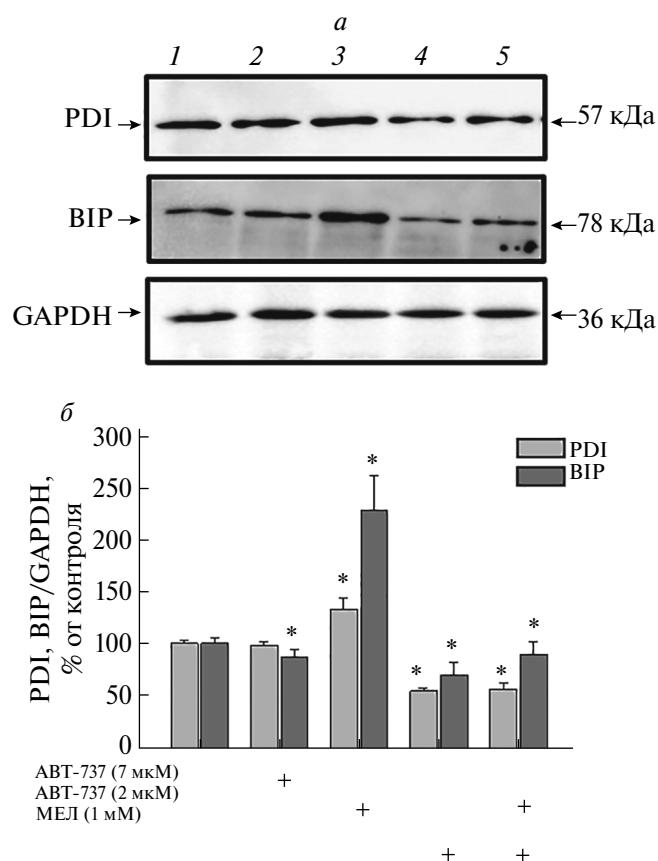


Рис. 7. Влияние МЕЛ и его комбинации с АВТ-737 на содержание ВІР и РDІ в клетках ТНР-1. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч. *а* – Иммуноокрашивание антителами к ВІР и РDІ, GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки. *б* – Диаграмма, отражающая соотношение ВІР к GAPDH. *в* – Диаграмма, отражающая соотношение РDІ к GAPDH. Уровень белка в клеточном лизате без каких-либо добавок служил контролем (100%). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 4$). * $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ – значимое изменение по сравнению с АВТ-737.

МВ-231 рака молочной железы как *in vitro*, так и *in vivo* [40], а также пролиферацию клеток MG-63 остеосаркомы человека [41]. Согласно полученным нами результатам, МЕЛ подавлял пролиферативную и митотическую активность клеток ТНР-1 ОМол. Следует отметить, что эффект подавления усиливался при применении комбинации МЕЛ и АВТ-737 в сниженной концентрации.

Противоопухолевое действие МЕЛ, как показано в ряде работ, имеет дозозависимый эффект. Для лечения различных типов рака необходимы относительно высокие концентрации МЕЛ как *in vitro* (0.1–10.0 мМ), так и *in vivo* (5–200 мг/кг) [7, 42, 43]. Высокие дозы МЕЛ требуются для достижения фармакологическо-

го эффекта. Нами показано, что использование МЕЛ в достаточно высокой концентрации не приводило к изменению жизнеспособности моноцитов (рис. 3).

Известно, что, когда ЭПР-стресс становится необратимым и нормальная функция ЭПР не может быть восстановлена, инициируется апоптоз, который в итоге приводит к гибели клетки. Апоптоз, вызванный ЭПР-стрессом, включает экспрессию/активацию проапоптотических молекул, в том числе СНОР, который регулирует про- и антиапоптотические белки, такие как белки семейства Bcl-2 (BclxL, Bclw и Mcl-1) и ВАК, Вах [44, 45]. Мы исследовали изменение содержания апоптотических белков Bcl-2 и Вах и наблюдали, что и сам МЕЛ, и МЕЛ совместно с АВТ-737 снижали экспрессию Bcl-2 и повышали содержание Вах (рис. 4). Кроме того, мы наблюдали повышение уровня СНОР в присутствии одного МЕЛ или МЕЛ в комбинации с АВТ-737 (рис. 5б). Предполагается, что и сам МЕЛ, и МЕЛ в комбинации с АВТ-737 в низкой концентрации активируют СНОР-опосредованный сигнальный каскад, что приводит к изменению содержания апоптотических белков Вах и Bcl-2. Полученные результаты соответствуют данным, согласно которым МЕЛ инициирует апоптоз за счет усиления активности каспаз-3, -8 и -9, изменения соотношения Вах/Bcl-2, расщепления PARP и повышения содержания белков цитохрома с, р53 и Fas-L при гепатоцеллюлярной карциноме, причем этот эффект опосредован повышением ЭПР-стресса, характеризующегося повышенной регуляцией ATF6 и СНОР [46].

Известно, что апоптоз, вызванный ЭПР-стрессом, включает активацию рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3R) и высвобождение Ca^{2+} через оксидоредуктин-1 α (ERO1- α), индуцированный СНОР [47]. Кроме того, на изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле активно реагируют различные органеллы клетки, в первую очередь митохондрии [48]. МЕЛ и его совместное применение с АВТ-737 повышали содержание цитозольного Ca^{2+} (рис. 5а). Поступление сверхпорогового Ca^{2+} в митохондриальный матрикс может привести к падению мембранного потенциала митохондрий и развитию окислительного стресса [49, 50]. Более того, накопление Ca^{2+} в митохондриях может сопровождаться повышением продукции АФК [51, 52]. Мы наблюдали, что применение МЕЛ и МЕЛ + АВТ-737 приводило к снижению мембранного потенциала и повышению внутриклеточной продукции АФК (рис. 6а, б). Накопленные данные показывают, что ЭПР-стресс может запускать аутофагию [26]. Кроме того, известно, что аутофагия может участвовать в гибели

клеток под влиянием различных стимулов или стресса [53], а МЕЛ может принимать участие в регуляции аутофагии [36], тогда как СНОР является прямым регулятором многочисленных генов, участвующих в процессе аутофагии [54, 55]. В настоящем исследовании нами показано повышение экспрессии маркеров аутофагии под действием МЕЛ и комбинации МЕЛ + АВТ-737 (рис. 6в).

Во многих видах опухолей содержание ВІР повышается, защищая опухолевые клетки от стресс-индуцированного апоптоза [56], а увеличенная экспрессия РDІ активно участвует в пролиферации, выживании и метастазировании некоторых типов опухолевых клеток [57]. При этом ЭПР-стресс активирует сигнальный путь, индуцирующий транскрипционный фактор СНОР, связанный с апоптозом, который активируется в сигнальном пути PERK-ATF4-СНОР [58]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что как сам МЕЛ, так и совместно с АВТ-737 в низких дозах вызывают ЭПР-зависимый стресс в клетках ОМол и запускают сигнальный путь активации проапоптотического фактора СНОР, при этом уровни шаперонов ВІР и РDІ снижаются (рис. 7), что способствует ослаблению защиты клеток ОМол от стресс-индуцированного апоптоза.

Предполагается, что механизм действия МЕЛ связан с СНОР-опосредованным повышением уровня цитозольного Ca^{2+} , который приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и повышению внутриклеточной продукции АФК, а активация СНОР стимулирует при этом аутофагию. Эти результаты согласуются с данными о связи СНОР с апоптозом посредством модуляции соотношения проапоптотических и антиапоптотических белков и его участия в высвобождении Ca^{2+} из ЭПР [47, 59]. Действие МЕЛ и его совместное применение с АВТ-737 приводит к снижению содержания Bcl-2 и увеличению Вах, что, в свою очередь, предполагает запуск апоптотического каскада. В этих условиях активация СНОР модулирует аутофагию, повышая содержание маркеров LC3A/B-I, II, в то время как снижение содержания шаперонов ВІР и РDІ “снимает” защиту клеток ТНР-1 от индукции апоптоза. Исходя из рассмотренных данных и результатов, полученных ранее на клетках HL-60 и MV4-11, можно заключить, что совместное использование МЕЛ со сниженными дозами химиотерапевтических препаратов представляется перспективным в терапии лейкозов.

Работа выполнена в рамках госзадания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (№ 075-01025-23-00).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Процедуры также были одобрены комитетом по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, протокол № 13/2023 от 8 февраля 2023 года. От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Kouchkovsky I., Abdul-Hay M. (2016) Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J.* **6**, e441.
2. Fernandez H.F., Sun Z., Yao X., Litzow M.R., Luger S.M., Paietta E.M., Racevskis J., Dewald G.W., Ketterling R.P., Bennett J.M., Rowe J.M., Lazarus H.M., Tallman M.S. (2009) Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1249–1259.
3. Coombs C.C., Tavakkoli M., Tallman M.S. (2015) Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J.* **5**, e304.
4. Guerra V.A., DiNardo C., Konopleva M. (2019) Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **32**, 145–153.
5. Oltsersdorf T., Elmore S.W., Shoemaker A.R., Armstrong R.C., Augeri D.J., Belli B.A., Bruncko M., Deckwerth T.L., Dinges J., Hajduk P.J., Joseph M.K., Kitada S., Korsmeyer S.J., Kunzer A.R., Letai A., Li C., Mitten M.J., Nettesheim D.G., Ng S., Nimmer P.M., O'Connor J.M., Oleksijew A., Petros A.M., Reed J.C., Shen W., Tahir S.K., Thompson C.B., Tomaselli K.J., Wang B., Wendt M.D., Zhang H., Fesik S.W., Rosenberg S.H. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* **435**, 677–681.
6. Matthews J.P., Bishop J.F., Young G.A., Juneja S.K., Lowenthal R.M., Garson O.M., Cobcroft R.G., Dodds A.J., Enno A., Gillett E.A., Hermann R.P., Joshua D.E., Ma D.D., Szer J., Taylor K.M., Wolf M., Bradstock K.F., Australian Leukemia Study G. (2001) Patterns of failure with increasing intensification of induction chemotherapy for acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **113**, 727–736.
7. Menendez-Pelaez A., Reiter R.J. (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal. Res.* **15**, 59–69.
8. Pourhanifteh M.H., Mahdavinia M., Reiter R.J., Asemi Z. (2019) Potential use of melatonin in skin can-

- cer treatment: a review of current biological evidence. *J. Cell. Physiol.* **234**, 12142–12148.
9. Pourhanifeh M.H., Mehrzadi S., Kamali M., Hosseinzadeh A. (2020) Melatonin and gastrointestinal cancers: current evidence based on underlying signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **886**, 173471.
 10. Wang J., Xiao X., Zhang Y., Shi D., Chen W., Fu L., Liu L., Xie F., Kang T., Huang W., Deng W. (2012) Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *J. Pineal. Res.* **53**, 77–90.
 11. Anderson G. (2020) The effects of melatonin on signaling pathways and molecules involved in glioma: melatonin and glioblastoma: pathophysiology and treatment. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **34**, 189–191.
 12. Buyukavci M., Ozdemir O., Buck S., Stout M., Ravindranath Y., Savasan S. (2006) Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **20**, 73–79.
 13. Bejarano I., Redondo P.C., Espino J., Rosado J.A., Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Pariente J.A., Rodriguez A.B. (2009) Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J. Pineal. Res.* **46**, 392–400.
 14. Shafabakhsh R., Mirzaei H., Asemi Z. (2020) Melatonin: a promising agent targeting leukemia. *J. Cell Biochem.* **121**, 2730–2738.
 15. Plaimee P., Weerapreeyakul N., Barusrux S., Johns N.P. (2015) Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* **48**, 67–77.
 16. Yi C., Zhang Y., Yu Z., Xiao Y., Wang J., Qiu H., Yu W., Tang R., Yuan Y., Guo W., Deng W. (2014) Melatonin enhances the anti-tumor effect of fisetin by inhibiting COX-2/iNOS and NF-kappaB/p300 signaling pathways. *PLoS One.* **9**, e99943.
 17. Shen Y.Q., Guerra-Librero A., Fernandez-Gil B.I., Florido J., Garcia-Lopez S., Martinez-Ruiz L., Mendivil-Perez M., Soto-Mercado V., Acuna-Castroviejo D., Ortega-Arellano H., Carriel V., Diaz-Casado M.E., Reiter R.J., Rusanova I., Nieto A., Lopez L.C., Escames G. (2018) Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. *J. Pineal. Res.* **64**(3). doi: 10.1111/jpi.12461
 18. Gao Y., Xiao X., Zhang C., Yu W., Guo W., Zhang Z., Li Z., Feng X., Hao J., Zhang K., Xiao B., Chen M., Huang W., Xiong S., Wu X., Deng W. (2017) Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF-kappaB/iNOS signaling pathways. *J. Pineal. Res.* **62**(2). doi: 10.1111/jpi.12380
 19. Baburina Y., Lomovsky A., Krestinina O. (2021) Melatonin as a potential multitherapeutic agent. *J. Pers. Med.* **11**(4), 274.
 20. Krestinina O., Fadeev R., Lomovsky A., Baburina Y., Kobyakova M., Akatov V. (2018) Melatonin can strengthen the effect of retinoic acid in HL-60 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2873.
 21. Lomovsky A., Baburina Y., Odinkova I., Kobyakova M., Evstratova Y., Sotnikova L., Krestinin R., Krestinina O. (2020) Melatonin can modulate the effect of navitoclax (ABT-737) in HL-60 cells. *Antioxidants* (Basel). **9**(11), 1143.
 22. Ломовский А.И., Бабурина Ю.Л., Фадеев Р.С., Ломовская Я.В., Кобякова М.И., Крестинин Р.Р., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В. (2023) Мелатонин может усиливать действие препаратов, применяемых при лечении лейкемии. *Биохимия.* **88**, 110–124.
 23. Ломовский А.И., Бабурина Ю.Л., Кобякова М.И., Фадеев Р.С., Акатов В.С., Крестинина О.В. (2020) Мелатонин усиливает химиотерапевтическое действие цитарабина в клетках HL-60. *Биол. Мембраны.* **37**, 103–109.
 24. Zeeshan H.M., Lee G.H., Kim H.R., Chae H.J. (2016) Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 327.
 25. Huber T.B., Walz G., Kuehn E.W. (2011) mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney Int.* **79**, 502–511.
 26. Cybulsky A.V. (2013) The intersecting roles of endoplasmic reticulum stress, ubiquitin-proteasome system, and autophagy in the pathogenesis of proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* **84**, 25–33.
 27. Yuzefovych L.V., LeDoux S.P., Wilson G.L., Racheck L.I. (2013) Mitochondrial DNA damage via augmented oxidative stress regulates endoplasmic reticulum stress and autophagy: crosstalk, links and signaling. *PLoS One.* **8**, e83349.
 28. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer.* **26**, 171–176.
 29. Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 555–561.
 30. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* **5**, e8668.
 31. Mediavilla M.D., Cos S., Sanchez-Barcelo E.J. (1999) Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Life Sci.* **65**, 415–420.
 32. Fornas O., Mato M.E., Webb S.M. (2000) Antiproliferative effect and cell cycle modulation by melatonin on GH(3) cells. *Horm. Res.* **53**, 251–255.
 33. Bejarano I., Espino J., Marchena A.M., Barriga C., Paredes S.D., Rodriguez A.B., Pariente J.A. (2011) Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **353**, 167–176.

34. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 49–63.
35. Bonora M., Pinton P. (2014) The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front. Oncol.* **4**, 302.
36. Boga J.A., Caballero B., Potes Y., Perez-Martinez Z., Reiter R.J., Vega-Naredo I., Coto-Montes A. (2019) Therapeutic potential of melatonin related to its role as an autophagy regulator: a review. *J. Pineal. Res.* **66**, e12534.
37. Kato H., Nishitoh H. (2015) Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer. *Front. Oncol.* **5**, 93.
38. Yorimitsu T., Nair U., Yang Z., Klionsky D.J. (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**, 30299–30304.
39. Akbarzadeh M., Movassaghpour A.A., Ghanbari H., Kheirandish M., Fathi Maroufi N., Rahbarghazi R., Nouri M., Samadi N. (2017) The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. *Sci. Rep.* **7**, 17062.
40. Sonehara N.M., Lacerda J.Z., Jardim-Perassi B.V., de Paula Jr R., Jr., Moschetta-Pinheiro M.G., Souza Y.S.T., de Andrade J.C.J., De Campos Zuccari D.A.P. (2019) Melatonin regulates tumor aggressiveness under acidosis condition in breast cancer cell lines. *Oncol. Lett.* **17**, 1635–1645.
41. Liu L., Xu Y., Reiter R.J. (2013) Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone.* **55**, 432–438.
42. Wang L., Wang C., Choi W.S. (2022) Use of melatonin in cancer treatment: where are we? *Int. J. Mol. Sci.* **23**(7), 3779.
43. Wang X., Wang B., Zhan W., Kang L., Zhang S., Chen C., Hou D., You R., Huang H. (2019) Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer *in vivo*. *Biomed. Pharmacother.* **117**, 109018.
44. Tsukano H., Gotoh T., Endo M., Miyata K., Tazume H., Kadomatsu T., Yano M., Iwawaki T., Kohno K., Araki K., Mizuta H., Oike Y. (2010) The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1925–1932.
45. Iurlaro R., Munoz-Pinedo C. (2016) Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* **283**, 2640–2652.
46. Dhillon S. (2018) Ivosidenib: first global approval. *Drugs.* **78**, 1509–1516.
47. Li G., Mongillo M., Chin K.T., Harding H., Ron D., Marks A.R., Tabas I. (2009) Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* **186**, 783–792.
48. Giorgi C., Romagnoli A., Pinton P., Rizzuto R. (2008) Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* **8**, 119–130.
49. Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., Rizzuto R. (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* **27**, 6407–6418.
50. Kruman I., Guo Q., Mattson M.P. (1998) Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **51**, 293–308.
51. Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 333–343.
52. Maciel E.N., Vercesi A.E., Castilho R.F. (2001) Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J. Neurochem.* **79**, 1237–1245.
53. Kim K.W., Moretti L., Mitchell L.R., Jung D.K., Lu B. (2010) Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by Perk-eIF2alpha in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene.* **29**, 3241–3251.
54. Rouschop K.M., van den Beucken T., Dubois L., Niessen H., Bussink J., Savelkoul K., Keulers T., Mujcic H., Landuyt W., Voncken J.W., Lambin P., van der Kogel A.J., Koritzinsky M., Wouters B.G. (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes *MAP1LC3B* and *ATG5*. *J. Clin. Invest.* **120**, 127–141.
55. Ubeda M., Wang X.Z., Zinszner H., Wu I., Habener J.F., Ron D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell Biol.* **1**, 1479–1489.
56. Kosakowska-Cholody T., Lin J., Srideshikan S.M., Scheffer L., Tarasova N.I., Acharya J.K. (2014) HKH40A downregulates GRP78/BiP expression in cancer cells. *Cell Death Dis.* **5**, e1240.
57. Lee E., Lee D.H. (2017) Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. *BMB Rep.* **50**, 401–410.
58. Nishitoh H. (2012) CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* **151**, 217–219.
59. Fernandez A., Ordonez R., Reiter R.J., Gonzalez-Gallego J., Mauriz J.L. (2015) Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J. Pineal. Res.* **59**, 292–307.

Melatonin Enhances the Effect of ABT-737 in Acute Monocytic Leukemia THP-1 Cells

A. I. Lomovsky¹, Yu. L. Baburina¹, R. S. Fadeev¹, M. I. Kobyakova^{1, 2},
Ya. V. Lomovskaya¹, R. R. Krestinin¹, L. D. Sotnikova¹, and O. V. Krestinina^{1, *}

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

² *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia*

*e-mail: ovkres@mail.ru

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, MEL) is a hormone synthesized by the pineal gland. Due to its oncostatic effect, it can be considered as an antitumor agent and used for combination therapy. ABT-737, a Bcl-2 inhibitor, promotes cell death after treatment with agents that induce pro-apoptotic signals. In the present study, the combined effect of MEL and ABT-737 on changes in proliferative and mitotic activity, mitochondrial membrane potential, intracellular production of reactive oxygen species (ROS) and cytosolic Ca²⁺ was studied. Moreover, changes in the expression of anti- and pro-apoptotic proteins (Bcl-2 and Bax), autophagy markers (LC3A/B (I, II)), endoplasmic reticulum stress markers (chaperones BIP and PDI, CHOP) were studied under these conditions. The effect of MEL together with ABT-737 led to an increase in the level of cytosolic Ca²⁺, intracellular production of ROS, and a decrease in the membrane potential of mitochondria. Under these conditions, the content of Bcl-2 increased, while the level of Bax decreased. The activation of CHOP stimulated autophagy and led to a decrease in the expression of BIP and PDI chaperones. These results suggest that MEL is able to enhance the effects of other chemotherapeutic agents and can be used in strategies in the treatment of cancer.

Keywords: acute monocytic leukemia, THP-1, melatonin (MEL), ABT-737, autophagy, ER-stress