

МЕЛАТОНИН МОЖЕТ УСИЛИВАТЬ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛЕЙКЕМИИ

© 2023 А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Р.С. Фадеев, Я.В. Ломовская,
М.И. Кобякова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова, О.В. Крестинина*

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2022

После доработки 21.12.2022

Принята к публикации 22.12.2022

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин, МЕЛ), секретируемый шишковидной железой, играет важную роль в регуляции различных функций в организме человека. Существуют доказательства, что МЕЛ оказывает противоопухолевое действие при различных видах рака. Мы изучили комбинированный эффект МЕЛ и препаратов из разных фармакологических групп, таких как цитарабин (ЦИТ) и навитоклакс (АВТ-737), на состояние опухолевого пула клеток острого миелоидного лейкоза на клеточной модели MV4-11. Совместное действие МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 способствовало снижению пролиферативной активности лейкозных клеток, снижению мембранного потенциала митохондрий, увеличению продукции активных форм кислорода и цитозольного Ca^{2+} . Мы показали, что МЕЛ вместе с ЦИТ или АВТ-737 увеличивает экспрессию гомологичного белка С/ЕВР и маркера аутофагии LC3A/B и снижает экспрессию протеин-дисульфидизомеразы и белка, связывающего иммуноглобулины, и, следовательно, может модулировать стресс эндоплазматического ретикулума и инициировать аутофагию. Полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение о том, что МЕЛ может иметь преимущества при лечении рака и рассматриваться как добавка к лекарственным средствам, используемым в терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мелатонин, цитарабин, навитоклакс, аутофагия, пролиферация, ЭПР-стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523010086, **EDN:** PCOUWC

ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы считаются одним из самых распространенных видов опухолевых заболеваний у детей. Однако пик заболеваемости приходится на возраст от 40 до 46 лет, и более 90% всех больных лейкемией являются взрослыми пациентами [1]. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой прогрессирующее гематологическое злокачественное новообразование, характеризующееся повышенной продукцией бластных клеток в костном мозге и периферической крови [2]. Это заболевание наиболее распространено среди взрослого населения, составляя около 90% случаев. Средний возраст при постановке диагноза – 65–70 лет [3]. В основе лечения

этого заболевания лежит применение химиотерапевтических ДНК-тропных препаратов, таких как цитарабин, доксорубин, этопозид и других. Цитарабин (1-β-D-арабинофуранозилцитозин, цитозинарабинозид, Ara-C, ЦИТ) является пролекарством и используется в качестве основной терапии ОМЛ уже более 40 лет [4]. Однако, помимо противоопухолевой активности, ЦИТ также обладает токсическим побочным действием. АВТ-737 представляет собой таргетный препарат, который воздействует на белки семейства Bcl-2, тем самым предотвращая их связывание с активаторами апоптоза (Bid, Bim, Puma) или сенситизаторами (Bad, Noxa). Исследования показали, что АВТ-737 обладает сильной противоопухолевой активностью в отношении широкого спектра

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; МЕЛ – мелатонин; МИ – митотический индекс; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ЦИТ – цитарабин; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; ВР – белок, связывающий иммуноглобулины; СНОР – моноклональный гомологичный белок С/ЕВР; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; PDI – протеин-дисульфидизомераза; ΔΨm – изменение мембранного потенциала.

* Адресат для корреспонденции.

раковых клеток, таких как миелома [5] и лимфома [6], и нескольких типов солидных опухолевых клеток, таких как глиобластома [7] и рак легких [8]. Несмотря на достигнутый прогресс в лечении ОМЛ, который значительно улучшил выживаемость у молодых пациентов, прогноз для пожилых остается неблагоприятным [9, 10].

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптами́н, МЕЛ) — индоламин, который вырабатывается не только шишковидной железой, но и другими органами, такими как костный мозг, сетчатка и кожа. Мелатонин участвует в регуляции циркадного ритма, тем самым связывая биохимические и физиологические потребности организма [11, 12]. Ряд исследований показал, что МЕЛ действует как иммунорегулятор и мощный антиоксидант, способный предотвращать гибель клеток в условиях окислительного стресса [13, 14]. Кроме того, было показано, что МЕЛ обладает противоопухолевой активностью при различных типах неопластических заболеваний, таких как рак кожи [15], глиома [16], рак желудочно-кишечного тракта [17], лейкемия [18, 19], рак молочной железы [20]. Одним из важных органоидов клетки является эндоплазматический ретикулум (ЭПР), который поддерживает гомеостаз Ca^{2+} , синтез липидов и является местом синтеза и фолдинга белков [21]. Zhou et al. [22] показали, что МЕЛ подавлял ЭПР-стресс, индуцированный высоким уровнем глюкозы, путем модулирования пути PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP в клетках остеобластов MC3T3-E1. Кроме того, комбинированное действие МЕЛ с индуктором ЭПР-стресса туникамицином повышало чувствительность опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 за счет ингибирования COX-2 и увеличения экспрессии CHOP (моноклональный гомологичный белок C/EBP) [23]. Moreira et al. [24] наблюдали, что МЕЛ был способен активировать ЭПР-стресс, характеризующийся повышенной экспрессией активирующего фактора транскрипции 6 (ATF6), CHOP и белка, связывающего иммуноглобулины (BIP) при индуцированной диэтилнитрозамином гепатоцеллюлярной карциноме у крыс, а также способствовал апоптозу за счет увеличения активности каспаз-3, -8 и -9, увеличения соотношения Bax/Bcl-2, расщепления протеинкиназы R-подобной киназы эндоплазматического ретикулума (PERK) и увеличения цитохрома c, p53 и белков Fas-L. Протеин-дисульфидизомераз (PDI) представляет собой белок с дисульфидизомеразной и оксидантной активностями для образования дисульфидных связей, способствует увеличению образования активных форм кислорода (АФК)

в клетках и участвует в поддержании Ca^{2+} -гомеостаза [25, 26].

Ранее мы показали, что МЕЛ совместно со сниженными концентрациями препаратов из различных фармакологических групп, а именно трансретиноевой кислотой (АТРА), цитарабином и АВТ-737, снижал пролиферацию клеток HL-60 (модель промиелоцитарной лейкемии), тем самым снижая пролиферативную активность и митотический индекс. Более того, мы наблюдали, что МЕЛ с исследуемыми препаратами подавлял экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 [27–29] и вызывал активацию ЭПР-стресса, модулируя путь PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP, тем самым увеличивая чувствительность клеток HL-60 к действию пониженной концентрации АВТ-737 [28]. Yoritatsu et al. [30] показали, что ЭПР-стресс инициирует аутофагию, которая проявляется как динамический процесс самопереваривания поврежденных органелл и неправильно свернутых белков в клетках.

Острый миеломоноцитарный лейкоз (клеточная модель MV4-11) представляет собой форму острого миелоидного лейкоза, которая включает пролиферацию миелобластов и монобластов, несущих транслокацию t(4;11), и внутреннюю tandemную дупликацию (ITD). Клетки, несущие ITD, обладают множественной лекарственной устойчивостью [31]. MV4-11 используется в качестве модели для изучения лекарственной устойчивости [32], а также чувствительности к классическим противоопухолевым препаратам (ЦИТ и др.) [33]. Показано, что МЕЛ может значительно повышать чувствительность клеток к химиопрепаратам и усиливать цитотоксичность, индуцированную ингибитором тирозинкиназы FLT3, сорафенибом. Важно отметить, что комбинированное действие МЕЛ и сорафениба продемонстрировало высокую синергетическую терапевтическую активность в отношении ксенотрансплантатов MV4-11 и мышиной модели лейкемии FLT3/ITD [34].

В настоящей работе мы исследовали влияние МЕЛ совместно с ЦИТ или АВТ-737 на пролиферативную активность, изменение мембранного потенциала, содержание цитозольного Ca^{2+} , продукцию АФК, а также изменения экспрессии маркеров ЭПР-стресса и аутофагии в клетках MV4-11. В этом исследовании мы использовали клеточную линию MV4-11 в качестве экспериментальной модели для изучения влияния МЕЛ на цитотоксические эффекты ЦИТ и АВТ-737. Исследование на клетках MV4-11 дополнит исследование, проведенное на клетках HL-60, и обобщит влияние противоопухолевого действия МЕЛ на клетки острого миелоидного лейкоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток линии MV4-11.

Клетки MV4-11 (CRL-9591) были приобретены у «ATCC» США. Клетки культивировали в среде RPMI/12 («Sigma-Aldrich», США), содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина («Sigma-Aldrich») в условиях CO₂-инкубатора («Binder», Германия) при 37 °C, влажности 95% и 5% CO₂. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 9–12 повторях, получая среднее значение. Усредненные значения по четырем экспериментам использовали для определения достоверности. В качестве контролей использовали клетки, не подвергавшиеся дополнительной обработке.

Тест на выживаемость (цитотоксический тест).

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. В работе использовали следующие реактивы: МЕЛ и резазурин («Sigma-Aldrich»); ЦИТ («Pfizer», США); АВТ-737 («Thermo Fisher Scientific», США). Клетки (с плотностью 5×10^3 клеток на лунку) высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали МЕЛ (1 мкМ–10 мМ), ЦИТ (1 нМ–10 мкМ) и АВТ-737 (1 нМ–10 мкМ) в указанных дозах. Через 24 ч после добавления исследуемых веществ в каждую лунку добавляли резазурин 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. Данные представлены в процентах от контроля (необработанные клетки).

Анализ митотического индекса. Для определения митотической активности клетки предварительно инкубировали с исследуемыми веществами в течение 24 ч. Затем клетки центрифугировали в течение 4 мин со скоростью 250 g, промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) и фиксировали в 70%-ном этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки отмывали от этанола в PBS, ресуспендировали в PBS, и затем клетки окрашивали бисбензимидазом H33342 («Sigma-Aldrich»). Митотические клетки подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 («Leica», Германия). Анализ значения митотического индекса (МИ) определяли по стандартной методике [25–27].

Анализ пролиферативной активности. Пролиферативную активность и гибель клеток

определяли с использованием красителя трипанового синего («Sigma-Aldrich») в культуральной среде. 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 десяти повторях.

Анализ продукции АФК. Продукцию АФК анализировали с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA, «Sigma-Aldrich») (Ex – 485 нм/Em – 530 нм). Для анализа продукции АФК клеточную суспензию (10⁶ клеток/мл) центрифугировали при 250 g, ресуспендировали в PBS и добавляли 10 мкМ DCFH-DA, после чего клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 10 мин. H₂O₂ (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. Изменение окислительной активности проводили на проточном цитометре BD Accuri C6 («Biosciences», США).

Анализ изменения митохондриального мембранного потенциала. Для анализа митохондриального потенциала 10⁶ клеток/мл ресуспендировали в PBS и инкубировали с DiOC6(3) («Sigma-Aldrich») в концентрации 10 нМ в условиях CO₂-инкубатора в течение 30 мин (Ex – 482 нм/Em – 501 нм). В качестве положительного контроля использовали сапонин (0,5%). Изменение мембранного потенциала измеряли на проточном цитометре BD Accuri C6.

Анализ цитозольного Ca²⁺. Изменение содержания цитозольного Ca²⁺ проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-4 AM («Sigma-Aldrich») (Ex – 494 нм/Em – 516 нм). Для оценки изменения содержания цитозольного Ca²⁺ клеточную суспензию (10⁶ клеток/мл) отмывали и ресуспендировали в PBS, после чего к суспензии добавляли Fluo-4 AM (2 мкМ) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. После окрашивания клетки дважды промывали и ресуспендировали в PBS, затем проводили измерения с помощью проточного цитометра BD Accuri C6.

Вестерн-блот-анализ. К клеткам добавляли выбранные количества МЕЛ (1 мМ), ЦИТ (0,4 мкМ и 1 мкМ) и АВТ-737 (20 нМ и 80 нМ). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным PBS и центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок солибилизировали в лизирующем буфере («Bio-Rad», США) с добавлением ингибиторов протеиназ/фосфатаз («Abscam», Великобритания). После инкубации в течение

2 ч при 4 °С и постоянном перемешивании образцы центрифугировали при 13 000 *g* в течение 10 мин. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда в супернатантах [35]. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов Лэммли («Bio-Rad») и нагревали при 95 °С в течение 5 мин. Полученные лизаты разделяли на белки с помощью 12,5%-ного SDS-PAGE. Затем белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью вестерн-блоттинга («Bio-Rad»). Мембрану блокировали в растворе Roti-block («Carl Roth GmbH + Co.», Германия) при комнатной температуре в течение одного часа. Затем мембрану промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Моноклональный гомологичный белок C/EBP (CHOP), антитела LC3A/B (I, II), поликлональные антитела к протеин-дисульфидизомеразе (PDI), белок, связывающий иммуноглобулины (BIP), а также антитела против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), используемые для нормализации белка, были получены от «Cell Signaling», США. Белковые полосы инициировали с использованием ECL («Bio-Rad») при помощи гель-документирующей системы ChemiDoc Touch Imaging System («Bio-Rad»).

Статистический анализ. Для статистического анализа мы использовали однофакторный дисперсионный анализ и соответствующий апостериорный анализ (Стьюдента–Ньюмена–Кейлса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование влияния различных концентраций МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на выживаемость клеток MV4-11. Сначала мы исследовали цитотоксический эффект МЕЛ (рис. 1, *а*) и химиотерапевтических препаратов, таких как АВТ-737

(рис. 1, *б*) и ЦИТ (рис. 1, *в*) в клетках MV4-11. Для этого клетки культивировали в течение 24 ч с различными концентрациями МЕЛ (от 1 мкМ до 10 мМ), АВТ-737 (от 1 нМ до 10 мкМ) и ЦИТ (от 1 нМ до 10 мкМ). Мы оценили влияние АВТ-737 (20 нМ и 80 нМ), ЦИТ (0,4 мкМ и 1 мкМ) и МЕЛ (1 мМ) на жизнеспособность клеток MV4-11. Потому как токсичность химиотерапевтических препаратов остается проблемой при лечении ОМЛ, мы использовали низкие концентрации ЦИТ и АВТ-737 с МЕЛ.

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на пролиферативную активность клеток MV4-11. На следующем этапе оценивали влияние изучаемых веществ на пролиферативную активность и гибель клеток. Эффект МЕЛ 1 мМ, АВТ-737 (20 нМ и 80 нМ), ЦИТ (0,4 мкМ и 1 мкМ) и комбинированный эффект МЕЛ 1 мМ с АВТ-737 (20 нМ) и ЦИТ (0,4 мкМ) были исследованы в клетках MV4-11 (рис. 2).

Мы наблюдали, что АВТ-737 (80 нМ) и ЦИТ (1 мкМ) снижали число жизнеспособных клеток MV4-11 на 20% по сравнению с контролем (рис. 2, *а* и *б*; столбцы 2 по сравнению с 1). Количество погибших клеток увеличилось в 4,3 раза в присутствии АВТ-737 (80 нМ) и в 4,5 раза — в присутствии ЦИТ (1 мкМ) по сравнению с контролем (рис. 2, *а* и *б*; столбцы 2 по сравнению с 1). В присутствии сниженных концентраций АВТ-737 (20 нМ) и ЦИТ (0,4 мкМ) количество живых (столбцы 3 по сравнению с 1) и количество мертвых клеток (столбцы 3 по сравнению с 1) значительно не отличалось от контроля. Добавление МЕЛ (1 мМ) к клеткам MV4-11 приводило к снижению количества жизнеспособных клеток на 30% по сравнению с контрольными значениями (столбцы 4 по сравнению с 1). Однако комбинированное действие МЕЛ со сниженными концентрациями АВТ-737 (20 нМ) уменьшало количество живых клеток примерно в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 2, *а*; столбец 5

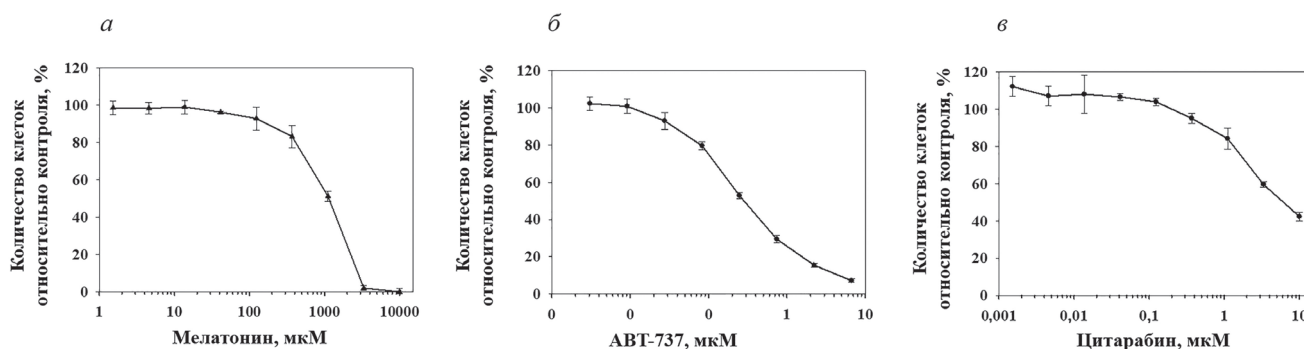
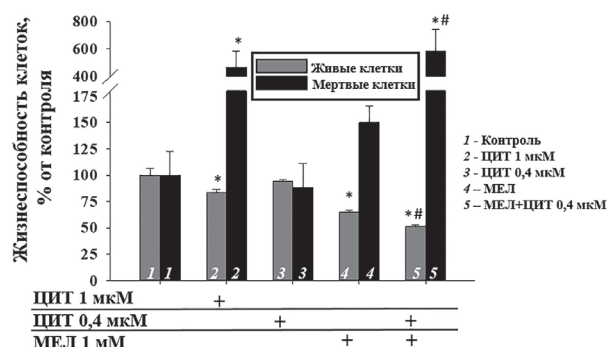
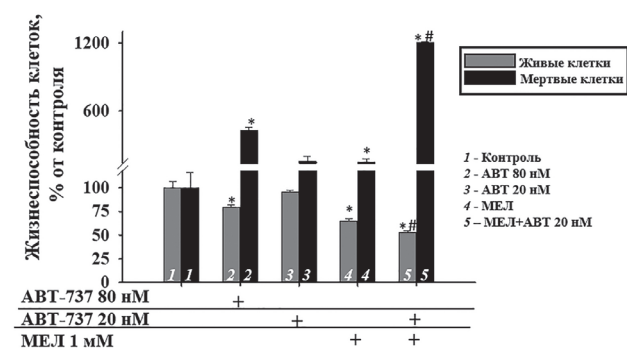


Рис. 1. Концентрационная зависимость цитотоксических эффектов МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ в клетках MV4-11. Клетки, инкубированные в культуральной среде, высевали в 96-луночный планшет при плотности 5×10^3 клеток на лунку и обрабатывали указанными концентрациями МЕЛ (*а*), АВТ-737 (*б*) и ЦИТ (*в*) в течение 24 ч. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) из десяти независимых экспериментов

а

б



в

г

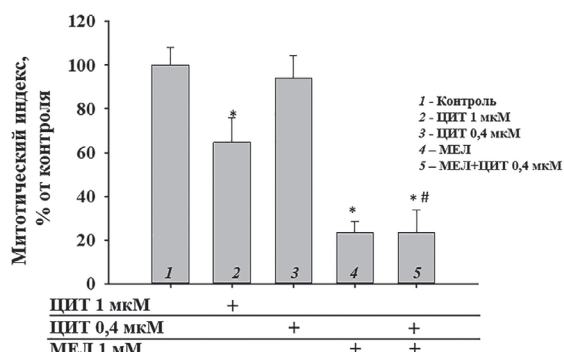
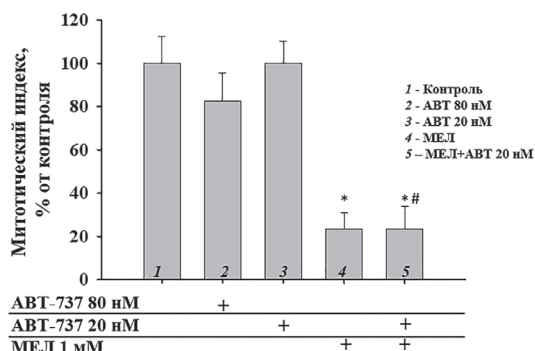


Рис. 2. Влияние МЕЛ, ЦИТ и АВТ-737 на жизнеспособность (а) и пролиферативную активность (б) клеток MV4-11. в – Изменение митотического индекса в присутствии МЕЛ и АВТ-737 в клетках MV4-11; г – изменение митотического индекса в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести независимых экспериментов. * $p < 0,05$ – достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления только АВТ-737 или ЦИТ (столбец 3)

по сравнению с 1) и на 50% – относительно АВТ-737 (20 нМ) (рис. 2, а; столбец 5 по сравнению с 3). При комбинированном действии МЕЛ с АВТ-737 количество погибших клеток MV4-11 увеличилось в 12 раз по сравнению с контролем (рис. 2, а; столбцы 5 по сравнению с 1) и в 10 раз – по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 2, а; столбец 5 по сравнению с 3). Совместное действие МЕЛ со сниженной концентрацией ЦИТ (0,4 мкМ) приводило к снижению количества живых клеток относительно контроля в 2 раза (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 1) и на 50% – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 3). Число погибших клеток в этих условиях увеличивалось в 6 раз по сравнению с контролем (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 1) и в 6 раз – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 2, б; столбец 5 по сравнению с 3).

Известно, что митотический индекс используется для анализа статуса пролиферации клеточной популяции. Мы проверили влияние исследуемых препаратов на изменение митотической активности в клетках MV4-11. Рис. 2, в и г отражает изменение МИ в клетках ОМЛ в присутствии исследуемых веществ.

АВТ-737 (80 нМ) не изменял МИ, в то время как ЦИТ (1 мкМ) снижал значение МИ на 40% по сравнению с контролем (рис. 2, г; столбец 2 по сравнению с 1). Сниженные концентрации АВТ-737 и ЦИТ не изменили МИ (рис. 2, в и г; столбцы 3 по сравнению с 1). Обработка MV4-11 МЕЛ (1 мМ) уменьшала значение МИ в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 2, в и г; столбец 4 по сравнению с 1). Комбинированное действие МЕЛ со сниженными концентрациями АВТ-737 и ЦИТ уменьшало МИ на 80% по сравнению с контролем (рис. 2, в и г; столбец 5 против 1) и на 80% – по сравнению с АВТ-737 и ЦИТ (рис. 2, в и г; столбец 5 по сравнению с 3). Полученные результаты позволяют предположить, что МЕЛ усиливает цитотоксический эффект АВТ-737 и ЦИТ в клетках MV4-11.

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение мембранного потенциала, продукции АФК и содержание цитозольного Ca^{2+} в клетках MV4-11. Известно, что окислительный стресс или перегрузка Ca^{2+} изменяют проницаемость внутренней митохондриальной мембраны. Падение мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), увеличение продукции АФК и выход Ca^{2+} в цитозоль приводят

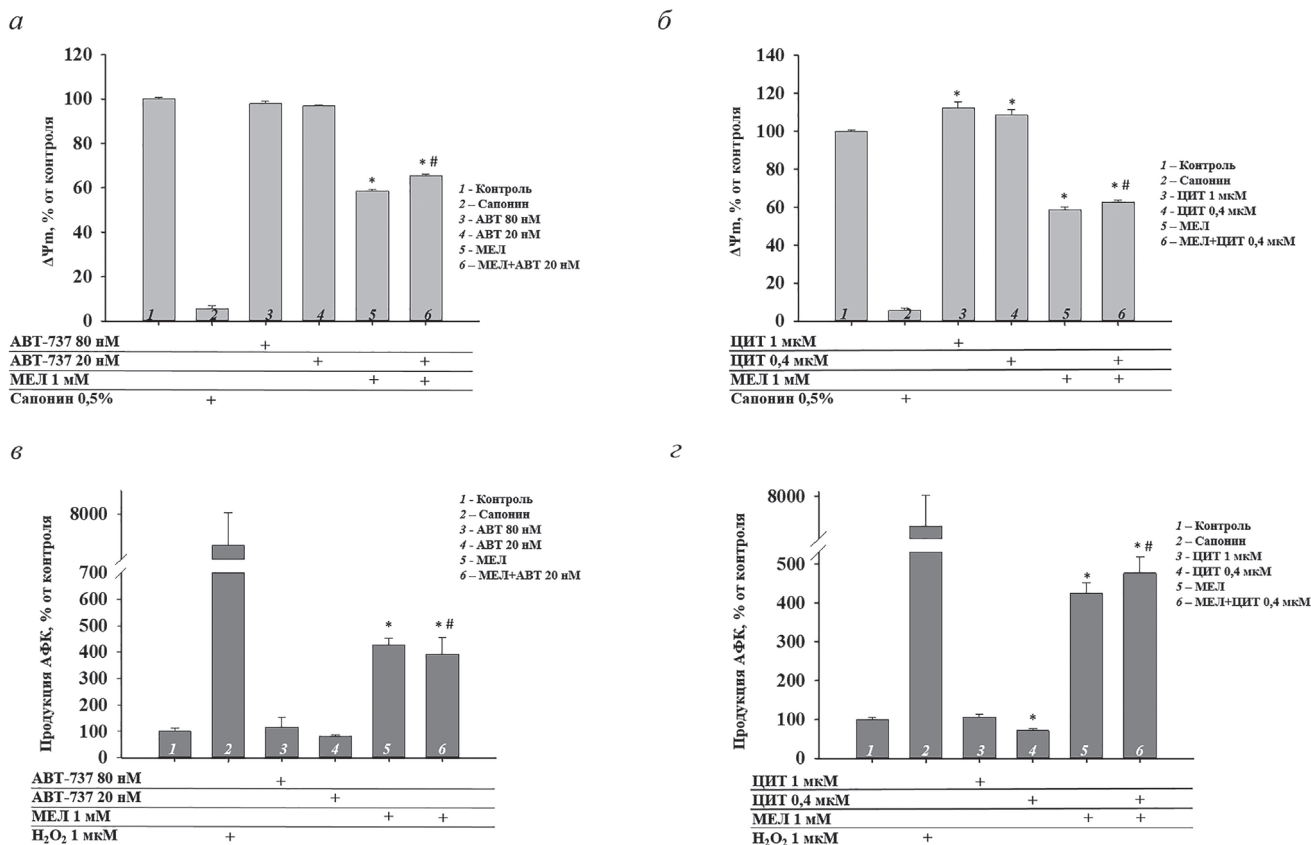


Рис. 3. Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) и продукцию АФК в клетках MV4-11. а – Изменение $\Delta\Psi_m$ в присутствии МЕЛ и АВТ-737; б – изменение $\Delta\Psi_m$ в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Контроль представлял собой необработанные клетки. В качестве положительного контроля использовали сапонин (0,5%); в – изменение продукции АФК в присутствии МЕЛ и АВТ-737; г – изменение продукции АФК в присутствии МЕЛ и ЦИТ. H_2O_2 (1 мкМ) использовали в качестве положительного контроля. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ – достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления только АВТ-737 или ЦИТ (столбец 4)

к изменению проницаемости внутренней митохондриальной мембраны [36]. Поэтому было исследовано изменение $\Delta\Psi_m$, продукции АФК (рис. 3) и цитозольного Ca^{2+} (рис. 4) в клетках MV4-11 в наших экспериментальных условиях.

АВТ-737 не влиял на изменение $\Delta\Psi_m$ по сравнению с контролем (рис. 3, а, столбцы 3 и 4 по сравнению с 1). Обработка клеток ЦИТ (1 и 0,4 мкМ) приводила к увеличению $\Delta\Psi_m$ на 15% по сравнению с контролем (рис. 3, б; столбцы 3 и 4 по сравнению с 1), тогда как МЕЛ снижал $\Delta\Psi_m$ на 40% по сравнению с контрольными условиями (рис. 3, а и б; столбец 5 по сравнению с 1). В условиях совместного действия МЕЛ с АВТ-737 наблюдали снижение $\Delta\Psi_m$ на 40% (рис. 3, а; столбец 6 по сравнению с 1) и на 40% – по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 3, а; столбец 6 по сравнению с 4). Добавление МЕЛ с ЦИТ приводило к снижению $\Delta\Psi_m$ на 40% по сравнению с контролем (рис. 3, б; столбец 6 по сравнению с 1) и на 55% – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 3, б; столбец 6 по сравнению с 4).

В присутствии ЦИТ (0,4 мкМ) продукция АФК снижалась на 20% в клетках MV4-11 (рис. 3, г; столбец 4 и 1). МЕЛ увеличил продукцию АФК в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 3, в и г; столбец 5 по сравнению с 1). При совместном действии МЕЛ с АВТ-737 (20 нМ) продукция АФК увеличивалась в 4 раза по сравнению с контролем (рис. 3, в; столбец 6 по сравнению с 1) и по сравнению с АВТ-737 (рис. 3, в; столбец 6 по сравнению с 4). Добавление ЦИТ с МЕЛ к клеткам приводило к увеличению продукции АФК в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 3, г; столбец 6 по сравнению с 1) и в 7 раз – по сравнению с одним ЦИТ (рис. 3, г; столбец 6 по сравнению с 4).

На следующем этапе исследования мы проанализировали изменение содержания цитозольного Ca^{2+} в клетках MV4-11 в наших экспериментальных условиях (рис. 4).

АВТ-737 (80 нМ) и ЦИТ (1 мкМ) повышали содержание цитозольного Ca^{2+} на 40 и 60% соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, а и б; столбец 2 по сравнению с 1).

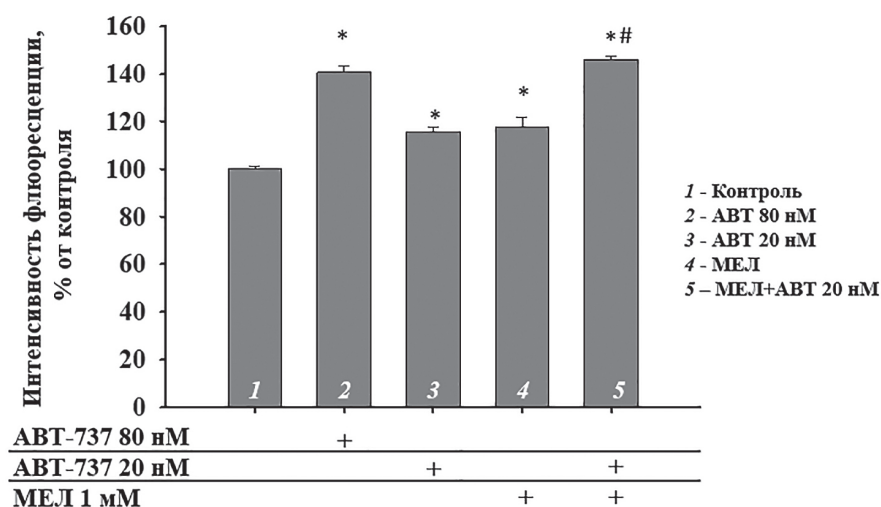
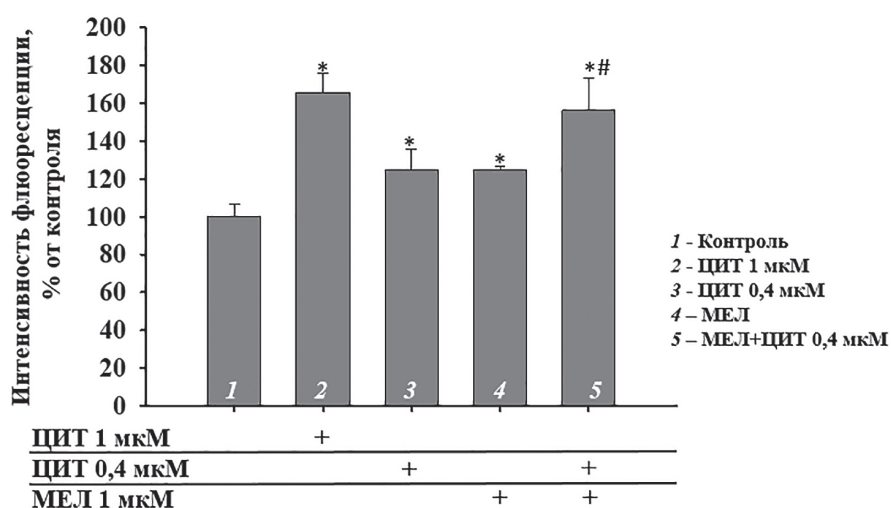
a*б*

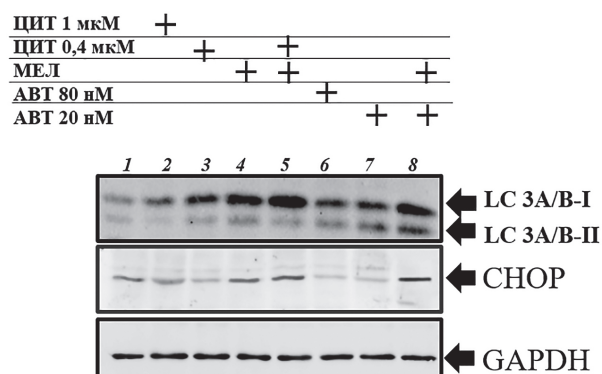
Рис. 4. Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение цитозольного содержания Ca^{2+} в клетках MV4-11. *a* — Изменение цитозольного Ca^{2+} в присутствии МЕЛ и АВТ-737; *б* — изменение цитозольного Ca^{2+} в присутствии МЕЛ и ЦИТ. Контроль представлял собой необработанные клетки. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из шести отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ — достоверная разница значений по сравнению с контролем; *# $p < 0,05$ — достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления только АВТ-737 или ЦИТ (столбец 3)

В присутствии АВТ-737 (20 нМ) содержание цитозольного Ca^{2+} увеличивалось на 10% (рис. 4, *a*; столбец 3 по сравнению с 1), а в присутствии ЦИТ (0,4 мкМ) — на 20% по сравнению с контролем (рис. 4, *б*; столбец 3 по сравнению с 1). Добавление МЕЛ повышало уровень цитозольного Ca^{2+} на 20% по сравнению с контролем (рис. 4, *a*; столбец 4 по сравнению с 1). Когда к клеткам добавляли МЕЛ с АВТ-737 или ЦИТ, содержание цитозольного Ca^{2+} увеличилось на 40% относительно контроля (рис. 4, *a* и *б*; столбец 5 по сравнению с 1), на 30% — по сравнению с АВТ-737 (рис. 4, *a*; столбец 5 по сравнению с 3)

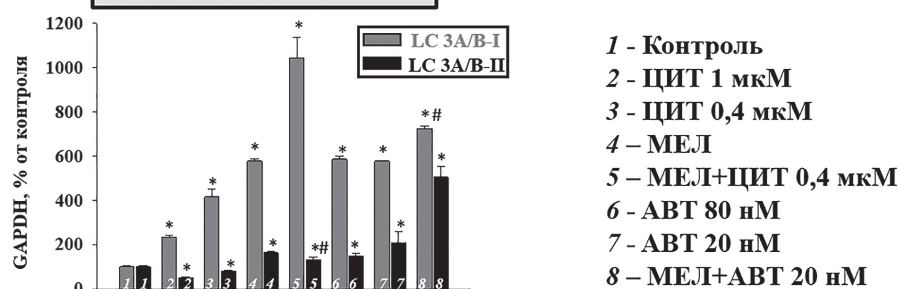
и на 40% — по сравнению с одним ЦИТ (рис. 4, *б*; столбец 5 по сравнению с 3).

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение содержания белков LC3A/B (I, II) и СНОР в клетках MV4-11. Ранее было показано, что в клетках HepG2 и клетках карциномы падение $\Delta\Psi\text{m}$ коррелировало с разобщением окислительного фосфорилирования и стимуляцией аутофагии [37]. Кроме того, СНОР связан с апоптозом, модулируя про- и антиапоптотические белки и участвуя в освобождении Ca^{2+} [38]. Кроме того, считается, что МЕЛ модулирует апоптоз и аутофагию в раковых клетках [39]. Поэтому

а



б



в

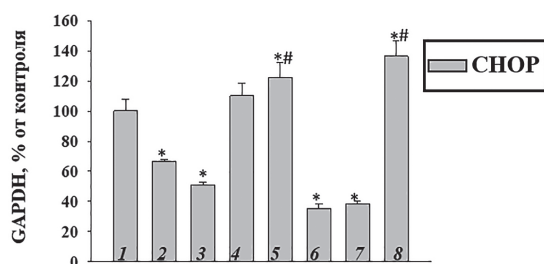


Рис. 5. Влияние МЕЛ, ЦИТ и АВТ-737 на изменение уровня LC3A/B и CHOP в MV4-11. а – Вестерн-блот маркера аутофагии LC3A/B и CHOP; диаграммы LC3A/B (б) и CHOP (в), количественно отражающие изменения содержания белков, нормированных на GAPDH, в % от контроля. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из трех отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ – достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ – достоверная разница по сравнению со значением, полученным после добавления ЦИТ (столбец 3) или только АВТ-737 (столбец 7)

на следующем этапе мы исследовали изменение уровней LC3A/B (I, II) и CHOP в клетках MV4-11 в наших экспериментальных условиях (рис. 5). Антитела к GAPDH использовали для нормализации белка.

На рис. 5, а показан вестерн-блот, окрашенный антителами LC3A/B (I, II) и CHOP. На диаграммах (рис. 5, б и в) представлены количественные изменения содержания белков, полученные с помощью компьютерной денситометрии. Мы наблюдали, что добавление ЦИТ (1 мкМ и 0,4 мкМ) увеличивало содержание LC3A/B-I в 2,4 и 4 раза соответственно (рис. 5, б; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1) и снижало уровень LC3A/B-II на 50 и 25% соответственно по сравнению с контролем (рис. 5, б; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1). В этих условиях содержание CHOP снижалось на 35 и 50% соответственно по сравнению с контролем

(рис. 5, в; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1). Добавление АВТ-737 (80 нМ) повышало уровни LC3A/B-I и LC3A/B-II в 6 раз и на 45% соответственно (рис. 5, б; столбец 6 по сравнению с 1) и снижало экспрессию CHOP на 65% по сравнению с контролем (рис. 5, в; столбец 6 по сравнению с 1). АВТ-737 (20 нМ) повышал содержание LC3A/B-I и LC3A/B-II в 6 и 2 раза, но снижал содержание CHOP на 65% (рис. 5, в; столбец 7 по сравнению с 1). МЕЛ повышал содержание LC3A/B-I в 5,8 раза и LC3A/B-II – на 60% (рис. 5, б; столбец 4 по сравнению с 1). Добавление МЕЛ не изменяло уровень CHOP, однако МЕЛ в сочетании с ЦИТ (0,4 мкМ) увеличивал содержание LC3A/B-I в 11 раз, LC3A/B-II – на 30%, а CHOP – на 20% по сравнению с контролем (рис. 5, б и в; столбец 5 по сравнению с 1). В условиях совместного действия МЕЛ с ЦИТ уровень LC3A/B-I увеличивался

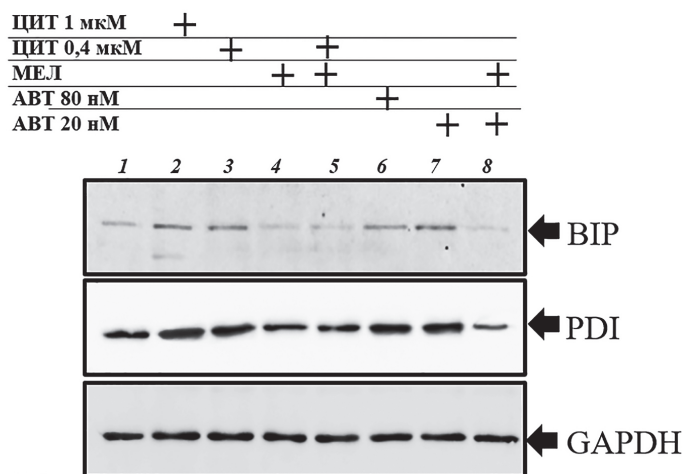
в 3 раза по сравнению с одним ЦИТ (рис. 5, б; столбец 5 по сравнению с 3), LC3A/B-II — на 40% (рис. 5, б; столбец 5 по сравнению с 3), а СНОР — на 70% (рис. 5, в; столбец 5 по сравнению с 3). При добавлении МЕЛ с АВТ-737 (20 нМ) к клеткам MV4-11 содержание LC3A/B-I увеличивалось в 7 раз, LC3A/B-II — в 5 раз, а СНОР — на 40% по сравнению с контролем (рис. 5, б и в; столбец 8 по сравнению с 1). Содержание LC3A/B-I увеличивалось на 28%, LC3A/B-II — в 2 раза и СНОР — в 3,5 раза по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 5, б и в; столбцы 8 по сравнению с 7).

Влияние МЕЛ, АВТ-737 и ЦИТ на изменение содержания белков PDI и VIP в клетках MV4-11. Известно, что ЭПР участвует во многих клеточных функциях, таких как кальциевый гомеостаз, синтез белков или фосфолипидов [40], а также способен регулировать активацию различных транскрипционных каскадов, внутриклеточный транспорт, митохондриальный биогенез, аутофагию и апоптоз [41]. Более того, для поддержания гомеостаза Ca^{2+} необходимы PDI и VIP [26].

Мы исследовали изменения экспрессии PDI и VIP в наших экспериментальных условиях (рис. 6).

В клетках MV4-11 результаты вестерн-блоттинга (рис. 6, а) показали, что в присутствии ЦИТ (1 и 0,4 мкМ) содержание VIP повышалось на 35 и 50% (рис. 6, б; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1), а PDI — на 80 и 57% соответственно (рис. 6, б; столбцы 2 и 3 по сравнению с 1). Добавление АВТ-737 (80 нМ) не изменяло содержание VIP (рис. 6, б; столбец 6 по сравнению с 1), тогда как добавление АВТ-737 (20 нМ) приводило к увеличению уровня VIP на 50% по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбец 7 по сравнению с 1). В присутствии АВТ-737 (80 и 20 нМ) уровень PDI повышался на 60 и 50% соответственно по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбцы 6 и 7 по сравнению с 1). МЕЛ снижал содержание VIP на 40%, а PDI — на 20% по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбец 4 по сравнению с 1). Совместное действие ЦИТ с МЕЛ снижало содержание VIP на 40% и PDI — на 10% относительно контроля (рис. 6, б; столбец 5 по сравнению с 1).

а



б

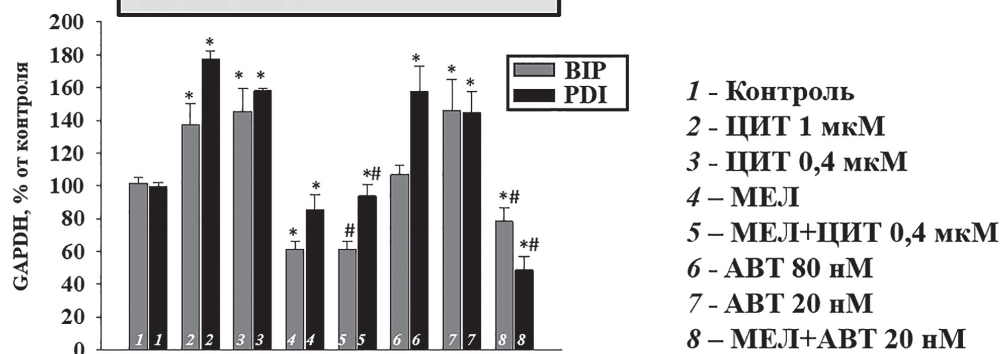


Рис. 6. Совместное влияние МЕЛ, ЦИТ и АВТ-737 на уровень маркеров ЭПР-стресса. а — Вестерн-блот PDI и VIP в клетках MV4-11; б — диаграммы, количественно отражающие изменения содержания белков, нормированных на GAPDH, в % от контроля. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SD из трех отдельных экспериментов. * $p < 0,05$ — достоверная разница значений по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ — значимое различие по сравнению со значением, полученным после добавления только ЦИТ (столбец 3) или АВТ-737 (столбец 7)

В присутствии ЦИТ и МЕЛ уровень VIP снижался на 90%, а PDI — на 60% по сравнению с одним ЦИТ (рис. 6, б; столбец 5 по сравнению с 3). Комбинированное действие АВТ-737 с МЕЛ снижало уровень VIP на 20%, а PDI — на 50% по сравнению с контролем (рис. 6, б; столбец 8 по сравнению с 1). В этих условиях уровень VIP снижался на 45%, а уровень PDI — в 3 раза по сравнению с одним АВТ-737 (рис. 6, б; столбец 8 по сравнению с 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что острый лейкоз считается одним из агрессивных видов опухолей. Поэтому исследования в этой области должны быть направлены на изучение и применение новых подходов для лечения этого вида рака. МЕЛ — гормон, вырабатываемый шишковидной железой, имеет структуру индоламина, и его предшественником является триптофан [42, 43]. Показано, что МЕЛ влияет на различные виды рака, в частности на рак молочной железы, колоректальный рак, опухоли кроветворной ткани и др. [44–46]. Противоопухолевые свойства МЕЛ предполагают его использование в качестве потенциального агента в новых терапевтических стратегиях при лечении рака. МЕЛ, который оказывает защитное действие на различные физиологические реакции в нормальных клетках костного мозга, также может быть эффективен при лечении лейкемии [47, 48]. Многочисленные исследования противоопухолевой активности МЕЛ в отношении лейкемии оценили полезные свойства МЕЛ при лечении лейкемии. Известно, что МЕЛ используется в качестве адъюванта при лечении рака не только за счет усиления терапевтического эффекта, но и за счет уменьшения побочных эффектов химиотерапии или облучения [49]. Таким образом, целью нашего исследования было изучение сочетанного действия МЕЛ с препаратами разных фармакологических групп, применяемых при лечении ОМЛ на клеточной модели MV4-11.

Недавно мы показали, что совместное действие МЕЛ с АТРА, ЦИТ или АВТ-737 снижали жизнеспособность и усиливали цитотоксический эффект этих препаратов в клетках промиелоцитарной лейкемии HL-60 [27–29, 50]. В настоящем исследовании мы наблюдали аналогичный эффект МЕЛ и комбинированное действие МЕЛ с ЦИТ и АВТ-737 в клетках ОМЛ клеточной модели MV4-11. Совместное действие МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 в концентрациях ниже тех, которые используют-

ся в медицинской практике, снижало пролиферацию и митотический индекс и усиливало цитотоксический эффект ЦИТ и АВТ-737.

Известно, что изменение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны происходит после открытия неспецифической поры митохондрий (mitochondrial permeability transition pore, мРТР) и рассматривается как начальная стадия апоптоза. Открытие мРТР сопровождается падением $\Delta\Psi_m$, деполяризацией митохондриальной мембраны, выходом Ca^{2+} из матрикса, набуханием митохондрий, увеличением продукции АФК, выходом цитохрома *c* из межмембранного пространства в цитозоль [29, 46, 47]. Более того, при транзиторной церебральной ишемии в культуре нейронов полосатого тела мыши, действуя как нейропротектор при церебральной ишемии, МЕЛ проявляет антиапоптотический эффект [51], а в раковых клетках МЕЛ действует как проапоптотический агент [52]. Недавно мы показали, что МЕЛ вместе с АВТ-737 (0,2 мкМ) ускорял открытие мРТР, при этом способность митохондрий удерживать Ca^{2+} в клетках HL-60 снижалась [28]. Важным свойством МЕЛ является его проапоптотический эффект, который может иметь особое значение при лечении рака [53]. В наших исследованиях мы обнаружили, что МЕЛ и совместное действие МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 снижали $\Delta\Psi_m$ и повышали уровень цитозольного Ca^{2+} в исследуемых клетках, тем самым проявляя проапоптотические свойства МЕЛ. Увеличение цитозольного Ca^{2+} и снижение $\Delta\Psi_m$ коррелируют с изменениями продукции АФК [54]. АФК, в свою очередь, тесно связаны с различными патологическими состояниями, в том числе онкологическими. Известно, что раковые клетки обычно генерируют большое количество АФК [55, 56]. Считается, что МЕЛ действует как антиоксидант в некоторых репродуктивных органах и может напрямую удалять различные свободные радикалы [57, 58]. С другой стороны, МЕЛ также может проявлять прооксидантные свойства, что связано с цитотоксическим эффектом в раковых клетках [59]. Увеличение продукции АФК в присутствии МЕЛ и МЕЛ в сочетании с ЦИТ и АВТ-737 в исследуемых клетках можно объяснить усилением их цитотоксичности.

Известно, что СНОР способен регулировать гены, кодирующие белки, участвующие в пролиферации, дифференцировке и экспрессии белков [60]. Имеются данные о том, что за счет модуляции про- и антиапоптотических белков и участия в освобождении Ca^{2+} , СНОР участвует в апоптозе [39].

В то же время ЭПР-стресс индуцирует СНОР, опосредуя апоптоз [61]. СНОР экспрессируется в небольших количествах, но при стрессе его экспрессия увеличивается [62]. В наших недавних исследованиях мы заметили, что МЕЛ, а также МЕЛ, добавленный к клеткам совместно с АВТ-737, снижал емкость Ca^{2+} и $\Delta\Psi_m$, и это коррелировало с увеличением экспрессии СНОР в клетках промиелоцитарной лейкемии [28]. В настоящем исследовании добавление МЕЛ и МЕЛ с ЦИТ или АВТ-737 к клеткам ОМЛ приводило к снижению $\Delta\Psi_m$, увеличению продукции цитозольного Ca^{2+} и АФК и к увеличению содержания СНОР. Более того, недавние исследования показали, что СНОР способствует транскрипции генов аутофагии и является прямым регулятором многочисленных генов, участвующих в процессе аутофагии [63, 64]. В нашем исследовании наблюдалось увеличение содержания маркеров аутофагии, таких как LC3A/B (I, II).

Считается, что окислительный стресс является индуктором ЭПР-стресса и аутофагии [65, 66]. В свою очередь, ЭПР-стресс может запускать аутофагию — многоступенчатый процесс самодеградаций клеточных компонентов [67, 68]. ЭПР-стресс имеет особое значение, поскольку ЭПР отвечает за фолдинг и транспорт белков, синтез липидов и поддержание гомеостаза Ca^{2+} в клетке. МЕЛ способен действовать в сочетании с ЭПР-стрессом, способствуя апоптозу раковых клеток [69]. Недавно мы наблюдали, что МЕЛ увеличивает экспрессию СНОР и снижает уровень BIP в клетках промиелоцитарной лейкемии [28], что может дополнительно способствовать апоптозу при канцерогенезе. BIP и PDI необходимы для поддержания гомеостаза Ca^{2+} [26]. Во многих видах рака содержание BIP повышается, и считается, что увеличение содержания BIP может защитить раковые клетки от стресс-индуцированного апоптоза [70]. PDI способен образовывать дисульфидные связи, включая сворачивание и изомеризацию белков, и увеличивать АФК в клетках [25]. PDI активно участвует в пролиферации, выживании и метастазировании некоторых типов раковых клеток [71]. Во многих раковых клетках, синтезирующих больше белков, чем в нормальных клетках, наблюдается повышенная экспрессия PDI [71]. Снижение $\Delta\Psi_m$, увеличение содержания цитозольного Ca^{2+} и продукции АФК коррелировало со снижением содержания BIP и PDI при обработке клеток MV4-11 МЕЛ с АВТ-737 или ЦИТ. Эти результаты предполагают усиление цитотоксического действия АВТ-737 и ЦИТ под действием МЕЛ в клетках MV4-11.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день все больше исследований доказывают, что МЕЛ способен воздействовать на клеточные и молекулярные мишени в лейкозных клетках, демонстрируя широкий спектр полезных эффектов индоламина при лейкемии. Важным направлением в лечении лейкемии является использование новых подходов для предотвращения развития опухоли. В настоящем исследовании мы проверили влияние совместного действия МЕЛ с препаратами из разных фармакологических групп, в частности ЦИТ и АВТ-737, на развитие острого миелоидного лейкоза на клеточной модели MV4-11. Мы заметили, что в этих условиях происходило увеличение продукции цитозольного Ca^{2+} и АФК и снижение мембранного потенциала. В этой модели клеток лейкемии уровень СНОР и LC3A/B увеличивался, а содержание BIP и PDI снижалось. Полученные результаты позволяют предположить, что МЕЛ может быть использован в качестве средства, усиливающего цитотоксическое действие препаратов, применяемых при лечении лейкозов. Обобщая результаты недавних и текущих исследований (влияние совместного действия МЕЛ с препаратами из разных фармакологических групп на клетки промиелоцитарной лейкемии и острого миелоидного лейкоза), можно предположить наличие предпосылок для применения МЕЛ в лечении лейкемии.

Вклад авторов. О.В. Крестинина, Р.С. Фадеев — концепция и руководство работой; А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Я.В. Ломовская, М.И. Кобякова, Р.Р. Крестинин, Л.Д. Сотникова — проведение экспериментов; А.И. Ломовский, О.В. Крестинина — обсуждение результатов исследования; А.И. Ломовский, Ю.Л. Бабурина, Р.Р. Крестинин — написание текста; О.В. Крестинина — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-315-90014) и государственного задания (№№ 075-01027-22-00 и 075-01025-23-00).

Благодарности. В работе использовали оборудование центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shafabakhsh, R., Mirzaei, H., and Asemi, Z. (2020) Melatonin: a promising agent targeting leukemia, *J. Cell Biochem.*, **121**, 2730-2738, doi: 10.1002/jcb.29495.
- De Kouchkovsky, I., and Abdul-Hay, M. (2016) Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update, *Blood Cancer J.*, **6**, e441, doi: 10.1038/bcj.2016.50.
- Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., and Zeidan, A. M. (2019) Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges, *Blood Rev.*, **36**, 70-87, doi: 10.1016/j.blre.2019.04.005.
- Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 1051-1062, doi: 10.1056/NEJM199909303411407.
- Kline, M. P., Rajkumar, S. V., Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L., Lust, J. A., Greipp, P. R., and Kumar, S. (2007) ABT-737, an inhibitor of bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells, *Leukemia*, **21**, 1549-1560, doi: 10.1038/sj.leu.2404719.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J. R., Certo, M., Love, T. M., Novina, C. D., and Letai, A. (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires bcl2 to sequester prodeath bim, explaining sensitivity to bcl2 antagonist abt-737, *J. Clin. Invest.*, **117**, 112-121, doi: 10.1172/JCI28281.
- Tagscherer, K. E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Bock, B. C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O. D., Herold-Mende, C., et al. (2008) Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of bcl-2 family proteins, *Oncogene*, **27**, 6646-6656, doi: 10.1038/onc.2008.259.
- Tahir, S. K., Yang, X., Anderson, M. G., Morgan-Lappe, S. E., Sarthy, A. V., Chen, J., Warner, R. B., Ng, S. C., Fesik, S. W., Elmore, S. W., et al. (2007) Influence of bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737, *Cancer Res.*, **67**, 1176-1183, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2203.
- Meyers, J., Yu, Y., Kaye, J. A., and Davis, K. L. (2013) Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: An analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs, *Appl. Health Econ. Health Policy*, **11**, 275-286, doi: 10.1007/s40258-013-0032-2.
- Shah, A., Andersson, T. M., Rachet, B., Bjorkholm, M., and Lambert, P. C. (2013) Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: A population-based study, *Br. J. Haematol.*, **162**, 509-516, doi: 10.1111/bjh.12425.
- Stehle, J. H., Saade, A., Rawashdeh, O., Ackermann, K., Jilg, A., Sebesteny, T., and Maronde, E. (2011) A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases, *J. Pineal Res.*, **51**, 17-43, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00856.x.
- Macchi, M. M., and Bruce, J. N. (2004) Human pineal physiology and functional significance of melatonin, *Front. Neuroendocrinol.*, **25**, 177-195, doi: 10.1016/j.yfrne.2004.08.001.
- Zhang, H. M., and Zhang, Y. (2014) Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions, *J. Pineal Res.*, **57**, 131-146, doi: 10.1111/jpi.12162.
- Galano, A., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2011) Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination, *J. Pineal Res.*, **51**, 1-16, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x.
- Pourhanifeh, M. H., Mahdavinia, M., Reiter, R. J., and Asemi, Z. (2019) Potential use of melatonin in skin cancer treatment: a review of current biological evidence, *J. Cell Physiol.*, **234**, 12142-12148, doi: 10.1002/jcp.28129.
- 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, doi: 10.1111/fcp.12538.
- Pourhanifeh, M. H., Mehrzadi, S., Kamali, M., and Hosseinzadeh, A. (2020) Melatonin and gastrointestinal cancers: Current evidence based on underlying signaling pathways, *Eur. J. Pharmacol.*, **886**, 173471, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173471.
- Sanchez-Hidalgo, M., Lee, M., de la Lastra, C. A., Guerrero, J. M., and Packham, G. (2012) Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines, *J. Pineal Res.*, **53**, 366-373, doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01006.x.
- Buyukavci, M., Ozdemir, O., Buck, S., Stout, M., Ravindranath, Y., and Savasan, S. (2006) Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: Relation with its pro-oxidant effect, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **20**, 73-79, doi: 10.1111/j.1472-8206.2005.00389.x.
- Ram, P. T., Dai, J., Yuan, L., Dong, C., Kiefer, T. L., Lai, L., and Hill, S. M. (2002) Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer, *Cancer Lett.*, **179**, 141-150, doi: 10.1016/S0304-3835(01)00873-4.
- Braakman, I., and Balleid, N. J. (2011) Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 71-99, doi: 10.1146/annurev-biochem-062209-093836.
- Zhou, R., Ma, Y., Tao, Z., Qiu, S., Gong, Z., Tao, L., and Zhu, Y. (2020) Melatonin inhibits glucose-induced apoptosis in osteoblastic cell line through perk-eif2alpha-atf4 pathway, *Front. Pharmacol.*, **11**, 602307, doi: 10.3389/fphar.2020.602307.

23. Zha, L., Fan, L., Sun, G., Wang, H., Ma, T., Zhong, F., and Wei, W. (2012) Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *J. Pineal Res.*, **52**, 322-331, doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00946.x.
24. Moreira, A. J., Ordóñez, R., Cerski, C. T., Picada, J. N., García-Palomo, A., Marroni, N. P., Mauriz, J. L., and González-Gallego, J. (2015) Melatonin activates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis, *PLoS One*, **10**, e0144517, doi: 10.1371/journal.pone.0144517.
25. Ali Khan, H., and Mutus, B. (2014) Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles, *Front. Chem.*, **2**, 70, doi: 10.3389/fchem.2014.00070.
26. Borges, J. C., and Ramos, C. H. (2005) Protein folding assisted by chaperones, *Protein Pept. Lett.*, **12**, 257-261, doi: 10.2174/0929866053587165.
27. Krestinina, O., Fadeev, R., Lomovsky, A., Baburina, Y., Kobayakova, M., and Akatov, V. (2018) Melatonin can strengthen the effect of retinoic acid in hl-60 cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2873, doi: 10.3390/ijms19102873.
28. Lomovsky, A., Baburina, Y., Odínokova, I., Kobayakova, M., Evstratova, Y., Sotnikova, L., Krestinin, R., and Krestinina, O. (2020) Melatonin can modulate the effect of navitoclax (ABT-737) in HL-60 cells, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 1143, doi: 10.3390/antiox9111143.
29. Lomovsky, A. I., Baburina, Y. L., Kobayakova, M. I., Fadeev, R. S., Akatov, V. S., and Krestinina, O. V. (2020) Melatonin strengthens a chemotherapeutic effect of cytarabin in HL-60 cells, *Biol. Membr.*, **37**, 103-109, doi: 10.1134/S1990747819060072.
30. Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30299-30304, doi: 10.1074/jbc.M607007200.
31. Quentmeier, H., Reinhardt, J., Zaborski, M., and Drexler, H. G. (2003) Flt3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines, *Leukemia*, **17**, 120-124, doi: 10.1038/sj.leu.2402740.
32. Alkhatabi, H. A., Zohny, S. F., Shait Mohammed, M. R., Choudhry, H., Rehan, M., Ahmad, A., Ahmed, F., and Khan, M. I. (2022) Venetoclax-resistant mv4-11 leukemic cells activate pi3k/akt pathway for metabolic reprogramming and redox adaptation for survival, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 461, doi: 10.3390/antiox11030461.
33. Elmeliegy, M., Den Haese, J., Talati, C., Wetzler, M., and Jusko, W. J. (2020) Towards better combination regimens of cytarabine and flt3 inhibitors in acute myeloid leukemia, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **86**, 325-337, doi: 10.1007/s00280-020-04114-z.
34. Gonzalez, A., Alonso-Gonzalez, C., Gonzalez-Gonzalez, A., Menendez-Menendez, J., Cos, S., and Martinez-Campa, C. (2021) Melatonin as an adjuvant to antiangiogenic cancer treatments, *Cancers (Basel)*, **13**, 3263, doi: 10.3390/cancers13133263.
35. Kruger, N. J. (1994) The Bradford method for protein quantitation, *Methods Mol. Biol.*, **32**, 9-15, doi: 10.1385/0-89603-268-X:9.
36. Bonora, M., and Pinton, P. (2014) The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death, *Front. Oncol.*, **4**, 302, doi: 10.3389/fonc.2014.00302.
37. Lyamzaev, K. G., Tokarchuk, A. V., Panteleeva, A. A., Mulikidjanian, A. Y., Skulachev, V. P., and Chernyak, B. V. (2018) Induction of autophagy by depolarization of mitochondria, *Autophagy*, **14**, 921-924, doi: 10.1080/15548627.2018.1436937.
38. Turpin, J., El-Safadi, D., Lebeau, G., Frumence, E., Despres, P., Viranaicken, W., and Krejbich-Trotot, P. (2021) Chop pro-apoptotic transcriptional program in response to er stress is hacked by zika virus, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3750, doi: 10.3390/ijms22073750.
39. Fernandez, A., Ordóñez, R., Reiter, R. J., González-Gallego, J., and Mauriz, J. L. (2015) Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis, *J. Pineal Res.*, **59**, 292-307, doi: 10.1111/jpi.12264.
40. Kato, H., and Nishitoh, H. (2015) Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer, *Front. Oncol.*, **5**, 93, doi: 10.3389/fonc.2015.00093.
41. Berridge, M. J. (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle, *Cell Calcium*, **32**, 235-249, doi: 10.1016/S0143416002001823.
42. Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., Mirzaei, H., Teymoordash, S. N., and Asemi, Z. (2019) Melatonin: a new inhibitor agent for cervical cancer treatment, *J. Cell Physiol.*, **234**, 21670-21682, doi: 10.1002/jcp.28865.
43. Reiter, R. J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocr. Rev.*, **12**, 151-180, doi: 10.1210/edrv-12-2-151.
44. Schernhammer, E. S., and Hankinson, S. E. (2005) Urinary melatonin levels and breast cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.*, **97**, 1084-1087, doi: 10.1093/jnci/dji190.
45. Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D. X., Leon, J., Manchester, L., and Reiter, R. J. (2005) Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism, *Prostate*, **63**, 29-43, doi: 10.1002/pros.20155.
46. Grin, W., and Grunberger, W. (1998) A significant correlation between melatonin deficiency and endometrial cancer, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **45**, 62-65, doi: 10.1159/000009926.
47. Zhelev, Z., Ivanova, D., Bakalova, R., Aoki, I., and Higashi, T. (2017) Synergistic cytotoxicity of melatonin and new-generation anticancer drugs against leukemia lymphocytes but not normal lymphocytes, *Anticancer Res.*, **37**, 149-159, doi: 10.21873/anticancerres.11300.
48. Tian, T., Li, J., Li, Y., Lu, Y. X., Tang, Y. L., Wang, H., Zheng, F., Shi, D., Long, Q., Chen, M., et al. (2019)

- Melatonin enhances sorafenib-induced cytotoxicity in flt3-itsd acute myeloid leukemia cells by redox modification, *Theranostics*, **9**, 3768-3779, doi: 10.7150/thno.34327.
49. Sanchez-Barcelo, E. J., Mediavilla, M. D., Alonso-Gonzalez, C., and Reiter, R. J. (2012) Melatonin uses in oncology: Breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **21**, 819-831, doi: 10.1517/13543784.2012.681045.
50. Baburina, Y., Lomovsky, A., and Krestinina, O. (2021) Melatonin as a potential multitherapeutic agent, *J. Pers. Med.*, **11**, 274, doi: 10.3390/jpm11040274.
51. Andrabi, S. A., Sayeed, I., Siemen, D., Wolf, G., and Horn, T. F. (2004) Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin, *FASEB J.*, **18**, 869-871, doi: 10.1096/fj.03-1031fje.
52. Rodriguez, C., Martin, V., Herrera, F., Garcia-Santos, G., Rodriguez-Blanco, J., Casado-Zapico, S., Sanchez-Sanchez, A. M., Suarez, S., Puente-Moncada, N., Anitua, M. J., et al. (2013) Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6597-6613, doi: 10.3390/ijms14046597.
53. Reiter, R. J., Tan, D. X., and Galano, A. (2014) Melatonin: exceeding expectations, *Physiology (Bethesda)*, **29**, 325-333, doi: 10.1152/physiol.00011.2014.
54. Zorov, D. B., Juhaszova, M., and Sollott, S. J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.*, **94**, 909-950, doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
55. Szatrowski, T. P., and Nathan, C. F. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells, *Cancer Res.*, **51**, 794-798.
56. Schumacker, P. T. (2006) Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword, *Cancer Cell*, **10**, 175-176, doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.015.
57. Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., and Qin, L. (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J. Pineal Res.*, **61**, 253-278, doi: 10.1111/jpi.12360.
58. Tamura, H., Jozaki, M., Tanabe, M., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Shinagawa, M., Tamura, I., Maekawa, R., Sato, S., Taketani, T., et al. (2020) Importance of melatonin in assisted reproductive technology and ovarian aging, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1135, doi: 10.3390/ijms21031135.
59. Sanchez-Sanchez, A. M., Martin, V., Garcia-Santos, G., Rodriguez-Blanco, J., Casado-Zapico, S., Suarez-Garnacho, S., Antolin, I., and Rodriguez, C. (2011) Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells, *Free Radic. Res.*, **45**, 1333-1341, doi: 10.3109/10715762.2011.623700.
60. Ubada, M., Wang, X. Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J. F., and Ron, D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor chop to a novel DNA control element, *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1479-1489, doi: 10.1128/MCB.16.4.1479.
61. Nishitoh, H. (2012) CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response, *J. Biochem.*, **151**, 217-219, doi: 10.1093/jb/mvr143.
62. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., and Ron, D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum, *Genes Dev.*, **12**, 982-995, doi: 10.1101/gad.12.7.982.
63. B'Chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013) The eif2alpha/atf4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7683-7699, doi: 10.1093/nar/gkt563.
64. Rouschop, K. M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujic, H., Landuyt, W., Voncken, J. W., et al. (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, doi: 10.1172/JCI40027.
65. Azad, M. B., Chen, Y., and Gibson, S. B. (2009) Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 777-790, doi: 10.1089/ars.2008.2270.
66. Gorlach, A., Klappa, P., and Kietzmann, T. (2006) The endoplasmic reticulum: Folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1391-1418, doi: 10.1089/ars.2006.8.1391.
67. Huber, T. B., Walz, G., and Kuehn, E. W. (2011) Mtor and rapamycin in the kidney: Signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression, *Kidney Int.*, **79**, 502-511, doi: 10.1038/ki.2010.457.
68. 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, doi: 10.1038/ki.2012.390.
69. Chovancova, B., Hudecova, S., Lencesova, L., Babula, P., Rezuchova, I., Penesova, A., Grman, M., Moravcik, R., Zeman, M., and Krizanov, O. (2017) Melatonin-induced changes in cytosolic calcium might be responsible for apoptosis induction in tumour cells, *Cell Physiol. Biochem.*, **44**, 763-777, doi: 10.1159/000485290.
70. Kosakowska-Cholody, T., Lin, J., Srideshikan, S. M., Scheffer, L., Tarasova, N. I., and Acharya, J. K. (2014) Hkh40a downregulates grp78/bip expression in cancer cells, *Cell Death Dis.*, **5**, e1240, doi: 10.1038/cddis.2014.203.
71. Lee, E., and Lee, D. H. (2017) Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer, *BMB Rep.*, **50**, 401-410, doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.8.107.

MELATONIN CAN ENHANCE THE EFFECT OF DRUGS USED IN THE TREATMENT OF LEUKEMIA

**A. I. Lomovskiy, Yu. L. Baburina, R. S. Fadeev, Y. V. Lomovskaya,
M. I. Kobyakova, R. R. Krestinin, L. D. Sotnikova, and O. V. Krestinina***

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: ovkres@mail.ru*

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, MEL), secreted by the pineal gland, plays an important role in the regulation of the different functions in human. However, there are the facts that MEL has an antitumor effect in various types of cancer. We have studied the combined effect of MEL and targeted drugs such as cytarabine (CYT) and navitoclax (ABT-737) on the development of acute myeloid leukemia in the MV4-11 cell model. The combined action of MEL with CYT or ABT-737 contributed to a decrease in the proliferative activity of leukemia cells, a drop in the membrane potential of mitochondria, and an increase in the production of reactive oxygen species and cytosolic Ca^{2+} . We have shown that MEL, together with CYT or ABT-737, increases expression of homologous C/EBP protein and autophagy marker LC3A/B and decreases protein disulfide isomerase and immunoglobulin-binding protein levels, and consequently modulate endoplasmic stress. reticulum and initiate autophagy. The obtained data support the earlier suggestion that MEL may have potential benefits in cancer treatment and may be considered as an additive to drugs used in therapy.

Keywords: melatonin; cytarabine; navitoclax; autophagy; proliferation, ER stress