

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА И ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА НА КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ N1E-115 (КЛОН C-1300)

© 2023 г. С.Н. Мякишева*,#, Ю.Л. Бабурина**, М.И. Кобякова**, Р.Р. Крестинин**,
Л.Д. Сотникова**, О.В. Крестинина**,##

*Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: *myakisheva@mail.ru

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики, РАН,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

##E-mail: *ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 07.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Изучено действие диэтилдителиокарбамата натрия, мелатонина и их совместного применения на пролиферативную активность, изменение цитозольного Ca^{2+} , мембранного потенциала и продукции активных форм кислорода в культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Было показано, что диэтилдителиокарбамат натрия и мелатонин ингибируют пролиферацию и усиливают дифференцировку клеток. При этом содержание анти-апоптотического белка Bcl-2 снижается, тогда как содержание про-апоптотического белка Bax повышается, что может предполагать запуск апоптотического каскада. Однако применение этих двух препаратов совместно не усиливало наблюдаемые эффекты. Видимо, механизмы, благодаря которым диэтилдителиокарбаматы и мелатонин действуют на клетки, различны.

Ключевые слова: диэтилдителиокарбамат натрия, мелатонин, пролиферация, дифференцировка, субъединицы комплексов дыхательной цепи митохондрий, продукция активных форм кислорода, митохондриальный мембранный потенциал, цитозольный кальций.

DOI: 10.31857/S0006302923050186, EDN: NAZGQY

Дителиокарбаматы являются хелаторами металлов на основе серы, которые содержат дителиокарбоксильную функциональную группу, конъюгированную с алифатической вторичной аминогруппой [1]. Дителиокарбаматы способны оказывать как прооксидантные, так и антиоксидантные эффекты в биологических системах [2]. Они широко применяются в качестве сельскохозяйственных инсектицидов, гербицидов и фунгицидов [3]. Обнаружены нейропротекторные, антимикробные и иммуномодулирующие свойства дителиокарбаматов. Дителиокарбаматы применяются в качестве спиновой ловушки нитрооксидного радикала NO в онкологических исследованиях. Более того, было показано, что в клетках нейробластомы SH-SY5Y дителиокарбаматы снижают жиз-

неспособность клеток, запускают апоптоз нейронов, индуцируют митохондриальную дисфункцию и генерируют продукцию активных форм кислорода (АФК) в дозозависимой манере. Дителиокарбаматы индуцировали апоптоз в клетках нейробластомы, повышая внутриклеточный уровень меди, запускающий высвобождение цитохрома c и активацию каспазы [1, 4]. В настоящее время дителиокарбаматы изучаются в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов в сочетании с другими лекарственными препаратами. Возможный синергизм или антагонизм дителиокарбаматов в сочетании с другими лекарственными препаратами может представлять интерес для исследования. Недавно мы исследовали совместное действие дителиокарбамата и B12b и заключили, что применение этих препаратов оказывает синергическое токсическое действие на опухолевые клетки (HEp-2), вызывая выраженный стресс эндоплазматического ретикула, обширную вакуолизацию и ингибирование апопто-

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, ДК — дителиокарбамат натрия, PBS — фосфатно-солевой буфер, GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, NSE — нейронспецифическая енолаза (neuron specific enolase).

за, что в конечном итоге приводит к индукции паратозоподобной гибели клеток [5].

В последние несколько лет в качестве лекарственного препарата, используемого в противоопухолевой терапии, применяется производное биогенного амина серотонина — эпифизарный гормон N-ацетил-5-метокситриптами (мелатонин). Амфифильные характеристики мелатонина позволяют ему достигать любого участка клетки или биологической жидкости [6]. Было показано, что мелатонин участвует в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки [7]. В наших исследованиях на культурах опухолевых клеток было обнаружено, что мелатонин обладает противоопухолевым действием [8–12].

Целью настоящего исследования было изучить влияние дитиокарбамата натрия (ДК) и мелатонина на пролиферативную активность, изменение цитозольного Ca^{2+} , мембранного потенциала и продукции АФК в клетках нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры и условия культивирования. Исследования проводили на культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300), полученной из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки нейробластомы культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (fetal bovine serum, Flow Laboratories, Великобритания) при 37°C, в атмосфере 5% CO_2 . В экспериментах в качестве контроля использовали среду DMEM без сыворотки и экспериментальную среду DMEM без сыворотки с добавлением диэтилдитиокарбамата натрия в концентрации 10^{-6} М и мелатонина в концентрации 10^{-5} М. Исследуемые препараты добавляли в культуру в логарифмической фазе роста через 24 ч после посева клеток во флаконы. Подсчет клеток проводили в девяти произвольно выбранных областях флакона. В контрольной и экспериментальной группах было не менее трех флаконов в каждой. Плотность посева в планшетовых флаконах объемом 50 мл составляла $5.5 \cdot 10^3$ клеток на см^2 при объеме среды 5 мл.

Оценка цитотоксического действия исследуемых препаратов на клетки нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300). Жизнеспособность клеток оценивали с использованием метода извлечения резазурина. Клетки с плотностью $5 \cdot 10^3$ клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. Через 24 ч клетки обрабатывали мелатонином (Sigma-Aldrich, США) (10^{-8} – 10^{-4} М) или ДК (Sigma-Aldrich, США) (10^{-7} – 10^{-3} М). Через 24 ч

после добавления исследуемых веществ в каждую лунку добавляли резазурин (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 4 ч в условиях CO_2 -инкубатора. Флуоресцентный анализ проводили на устройстве для считывания микропланшетов Infinite F200 (Tecan, Швейцария) при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны испускания 595 нм.

Измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода. Продукцию АФК измеряли с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich, США) (длина волны возбуждения 485 нм, длина волны испускания 530 нм). Для анализа продукции АФК в клетке ($5 \cdot 10^5$ клеток/мл) добавляли 10 мкМ красителя, после чего клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 10 мин. После этого клетки однократно промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS). H_2O_2 (1 мкМ) использовали в качестве положительно-го контроля. Измерение окислительной активности проводили на проточном цитометре BD Accuri C6 (Biosciences, США).

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

Измерение содержания цитозольного Ca^{2+} . Изменение содержания цитозольного Ca^{2+} проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-4 AM (Sigma-Aldrich, США) (длина волны возбуждения 494 нм, длина волны испускания 516 нм). Для оценки изменения содержания цитозольного Ca^{2+} ($5 \cdot 10^5$ клеток/мл) клеток отмывали в PBS. К клеточной суспензии добавляли Fluo-4 AM (2 мкМ) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 30 мин. После окрашивания клетки дважды промывали PBS. Содержание Ca^{2+} в цитозоле измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Biosciences, США).

Электрофорез и вестерн-блоттинг. К клеточной суспензии добавляли выбранные количества мелатонина (10^{-5} М) и ДК (10^{-6} М). Через 24 ч клетки дважды промывали ледяным PBS и центрифугировали при 1500 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок

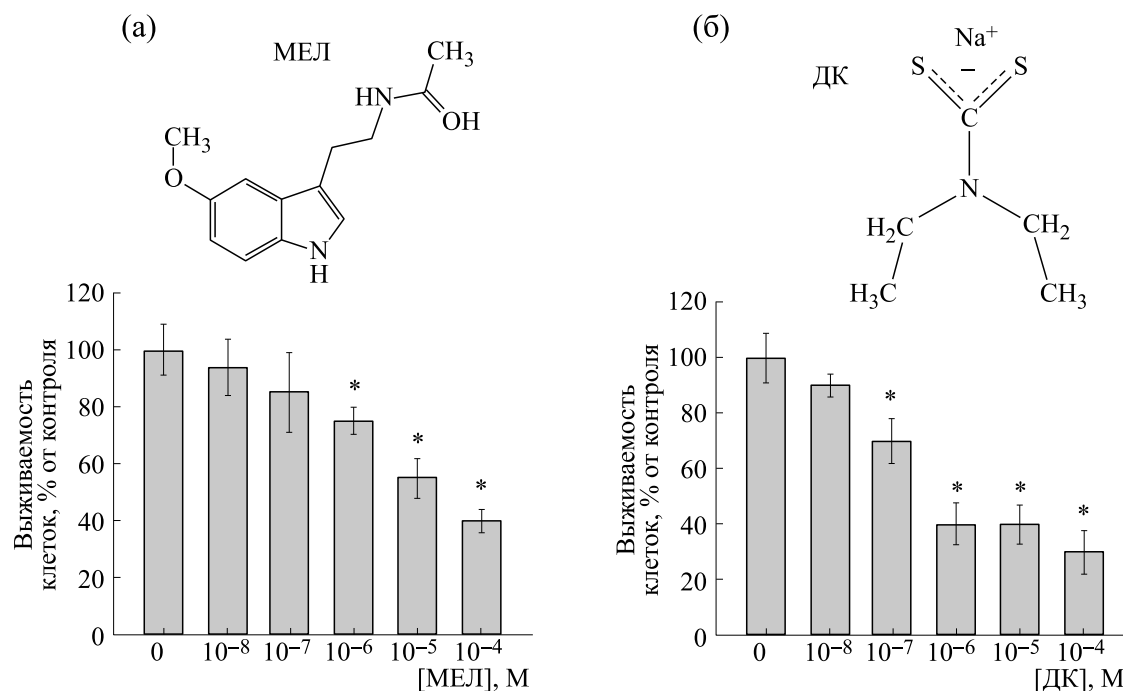


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности клеток нейробластомы мыши N1E-115 от концентрации мелатонина (а) и дитиокарбоната натрия (б). Долю живых клеток определяли через 24 ч после добавления препаратов и интенсивности восстановления резазурина. Количество клеток интактной культуры (без обработки препаратами) принимали за 100%. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$), * $p < 0.05$ — достоверная разница по сравнению с контролем.

солюбилизировали в лизирующем буфере (RIPA) с добавлением ингибиторов протеиназ/фосфатаз, держали во льду в течение 30 минут и центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин. Концентрацию белка в супернатантах измеряли по методу Брэдфорда. Полученные образцы растворяли в буфере для образцов по Лэммли (Bio-Rad, США) и нагревали до 95°C в течение 5 мин. Полученные лизаты разделяли на белки с помощью электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле. Затем белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) с помощью метода вестерн-блоттинга. Мембрану блокировали в растворе Roti-block (Carl Roth GmbH, Германия) при комнатной температуре в течение одного часа. Затем мембрану промывали водой и инкубировали с первичными антителами, как описано в инструкции. Изменения в уровнях основных субъединиц электронно-транспортной цепи определяли с помощью коктейля антител Total Oxphos Rodent WB Antibody Cocktail (моноклональные антитела). Коктейль антител Oxphos состоит из альфа-субъединицы комплекса V (CV-ATP5A — 55 кДа), цитохрома b -c1 complex subunit 2 комплекса III (CIII-UQCRC2-48 кДа), сукцинатдегидрогеназы комплекса II (CII-SDHB — 30 кДа), NADH:убихинон оксидоредуктазы Complex Assembly Factor 8 — 20 кДа комплекса I (CI-NDUFB8). Моноклональные антитела к Bcl-2 были произведе-

ны в компании Santa Cruz Biotechnology (США), моноклональные антитела к Bax — в компании Abcam (Великобритания). Для нормализации белка использовали анти-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) (Cell Signaling, США). Белковые полосы инициировали с использованием системы обнаружения ECL (ChemiDoc Touch Imaging System, Bio-Rad, США).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чтобы выявить цитотоксическое действие препаратов, клетки нейробластомы мыши N1E-115 культивировали в течение 24 ч с различными концентрациями мелатонина (от 10^{-8} до 10^{-3} М) и ДК (от 10^{-7} до 10^{-4} М) (рис. 1). На рис. 1а показана структурная формула мелатонина и диаграмма, отражающая жизнеспособность клеток. Мелатонин при концентрации 10^{-8} и 10^{-7} М не оказывал влияния на жизнеспособность клеток нейробластомы мыши. Однако при концентрации мелатонина от 10^{-6} до 10^{-4} М жизнеспособ-

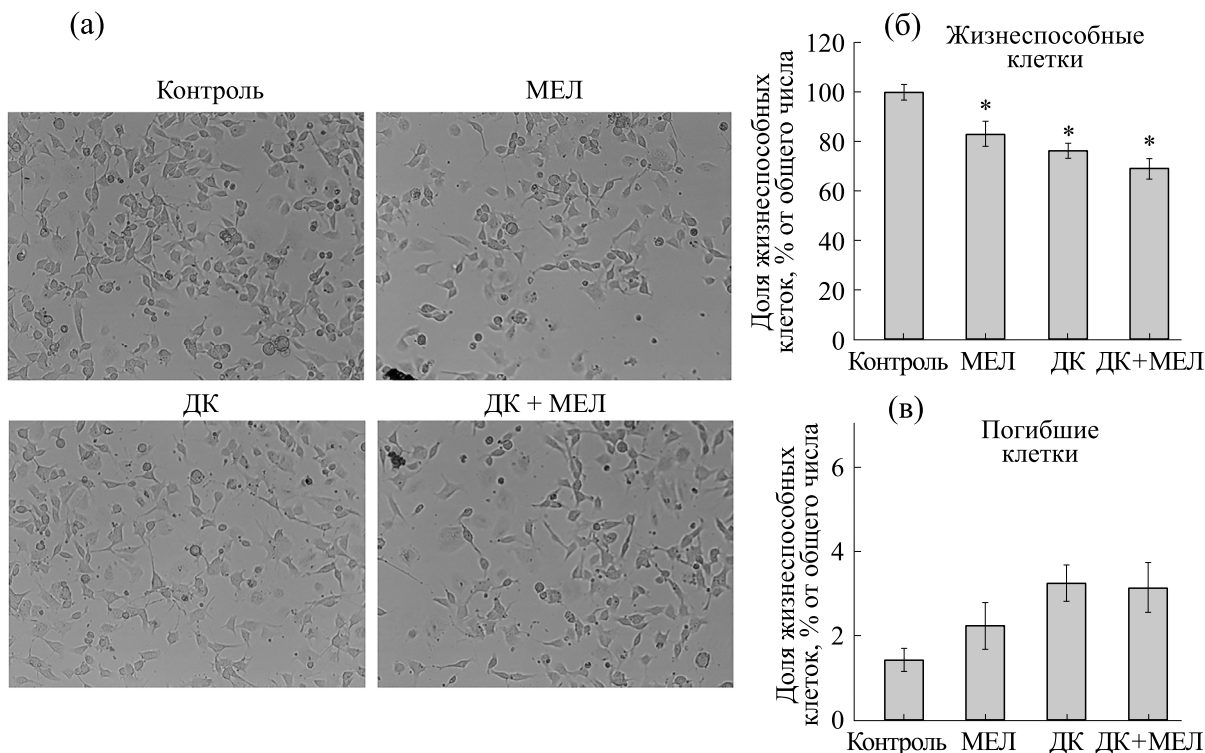


Рис. 2. Морфологический статус культуры нейробластомы мыши N1E-115 при инкубации с мелатонином (10^{-5} М), дитиокарбоматом натрия (10^{-6} М) и их совместным действием через 24 ч культивирования: (а) — микрофотографии клеток с исследуемыми веществами; (б) — изменение количества жизнеспособных клеток после 24 ч культивирования в средах, содержащих мелатонин и ДК; (в) — изменение количества погибших клеток. Количественные изменения отображены в процентах относительно общего количества клеток. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$); * $p < 0.05$ — достоверная разница по сравнению с контролем.

ность клеток снижалась на 25, 45 и 60% соответственно относительно контроля. Аналогичным образом мы подобрали нетоксичную концентрацию ДК (рис. 16). Из рисунка видно, что ДК при 10^{-7} М не оказывал влияния на жизнеспособность клеток нейробластомы, тогда как с увеличением концентрации от 10^{-6} до 10^{-3} М жизнеспособность клеток снижалась на 25, 60 и 70% соответственно. Поскольку жизнеспособность клеток снижалась почти на 50% при воздействии мелатонина в концентрации 10^{-5} М и ДК в концентрации 10^{-6} М, эти концентрации препаратов мы использовали для дальнейшего исследования.

На следующем этапе исследования изучали изменение пролиферации в клетках нейробластомы мыши N1E-115 в наших экспериментальных условиях (рис. 2). Было выявлено, что культивирование клеток с мелатонином в течение 24 ч приводило к снижению прироста клеток на 20% (рис. 2а), тогда как ДК снижал число жизнеспособных клеток на 25%. Обработка клеток совместно с мелатонином и ДК позволила снизить число живых клеток на 30% относительно контроля. Стоит отметить, что число погибших кле-

ток во всех изучаемых условиях было незначительным и не отличалось от контроля (рис. 2б).

Известно, что белок нейронспецифическая енолаза (NSE) считается одной из структурных разновидностей фермента енолазы. Клетки нейробластомы характеризуются высоким потенциалом дифференцировки *in vivo* и *in vitro* и поэтому представляют собой идеальную модель для изучения модуляции экспрессии специфических молекул во время дифференцировки нейронов. В качестве маркера дифференцировки используется NSE [13]. На рис. 3 показано изменение содержания NSE в клетках нейробластомы мыши в присутствии мелатонина и ДК и их совместное действие через 24 ч культивирования. Верхняя часть рисунка — вестерн-блот, окрашенный антителами к NSE и GAPDH, нижняя часть отражает количественную характеристику изменения фермента как соотношение NSE к GAPDH. Из рис. 3 видно, что мелатонин повышал содержание белка на 40%, тогда как ДК — на 50% по сравнению с контролем. Совместное действие мелатонина и ДК не изменяло уровня белка относительно контроля.

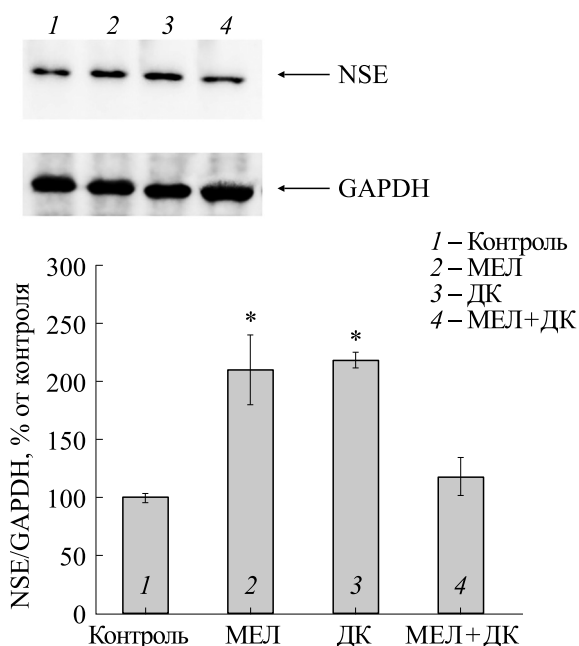


Рис. 3. Влияние мелатонина и ДК на изменение содержания нейронспецифичной енолазы в клетках нейробластомы мыши N1E-115: (а) — иммуноокрашивание антителами к NSE и GAPDH в клетках нейробластомы; (б) — диаграмма, количественно отражающая изменения содержания белка, нормированного на GAPDH (в % от контроля). Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные по трем независимым экспериментам представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0.05$ — достоверное различие по сравнению с контролем.

Далее мы проанализировали изменение уровня основных субъединиц комплексов ЭТЦ в клетках нейробластомы мыши в наших экспериментальных условиях. На рис. 4 показан вестерн-блот, окрашенный антителами к OXPHOS и представлены количественные изменения как соотношения белков к GAPDH. Из рисунка видно, что мелатонин повышал содержание субъединицы АТФазы АТР5А на 50%, тогда как ДК — на 25%. При совместном действии уровень субъединицы АТР5А увеличивался на 40% по сравнению с контролем (рис. 4б). Содержание субъединицы UQCRC2 комплекса III (рис. 4в) в присутствии мелатонина не изменялось по сравнению с контролем, в то время как ДК повышал уровень субъединицы на 25%, а при совместном применении двух препаратов — на 23%. Содержание субъединицы SDHB комплекса II под действием мелатонина не изменялось, ДК снижал ее на 40%, тогда как при их совместном использовании уровень субъединицы не изменялся по сравнению с контролем (рис. 4г). Мелатонин снижал уровень субъединицы NDUFB8 комплекса I на 25%, а ДК — на 30%. При совместном действии мелато-

нина и ДК содержание NDUFB8 не изменялось по сравнению с контролем (рис. 4д).

На следующем этапе мы исследовали влияние мелатонина и ДК на изменение митохондриального мембранного потенциала $\Delta\Psi_m$, продукции АФК и цитозольного Ca^{2+} (рис. 5) в клетках нейробластомы мыши. Валиномицин (250 нМ), H_2O_2 и туникамицин использовали соответственно в качестве положительного контроля. Мелатонин снижал $\Delta\Psi_m$ в 6 раз, ДК — на 50% по сравнению с контролем, тогда как при совместном применении мелатонина и ДК эффект не наблюдался (рис. 5а). При обработке клеток мелатонином продукция АФК снижалась на 50%, в то время как ДК не изменял этот параметр по сравнению с контролем. При совместном действии мелатонина и ДК продукция АФК увеличивалась в 6 раз по сравнению с контролем (рис. 5б). Содержание цитозольного Ca^{2+} снижалось на 10% в присутствии мелатонина, на 15% в присутствии ДК и не изменялось при совместном использовании этих двух препаратов (рис. 5в).

Известно, что мелатонин способен модулировать индукцию апоптоза в различных типах клеточных линий, поэтому мы проверили изменение содержания анти- и проапоптотических белков, таких как соответственно Bcl-2 и Bax, в наших экспериментальных условиях в клетках нейробластомы. На рис. 6 показаны вестерн-блоты, окрашенные антителами к Bcl-2 и Bax. GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. Количественные характеристики представлены как соотношение оптической плотности белков к GAPDH. Из рисунка видно, что мелатонин снижал содержание Bcl-2 на 35% и повышал Bax в 2 раза по сравнению с контролем. Уровень Bcl-2 снижался на 50% в присутствии ДК, а уровень Bax — в 3 раза по сравнению с контролем. При совместном использовании препаратов мы заметили, что мелатонин снижал содержание Bcl-2 на 80%, тогда как содержание Bax повышалось в 2 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Совместное использование препаратов, направленных на снижение/повышение пролиферативной активности представляет собой многообещающий терапевтический подход к заболеваниям различной природы. Так недавно было установлено, что дитиокарбамат, который считается хелатором ионов тяжелых металлов [2], в комплексе с другим членом тиолсодержащего препарата может применяться в антираковой терапии [14–16]. Другим препаратом, широко используемым в последнее время в онкологической практике как дополнение к общеизвестным химиотерапевтическим препаратам, является мела-

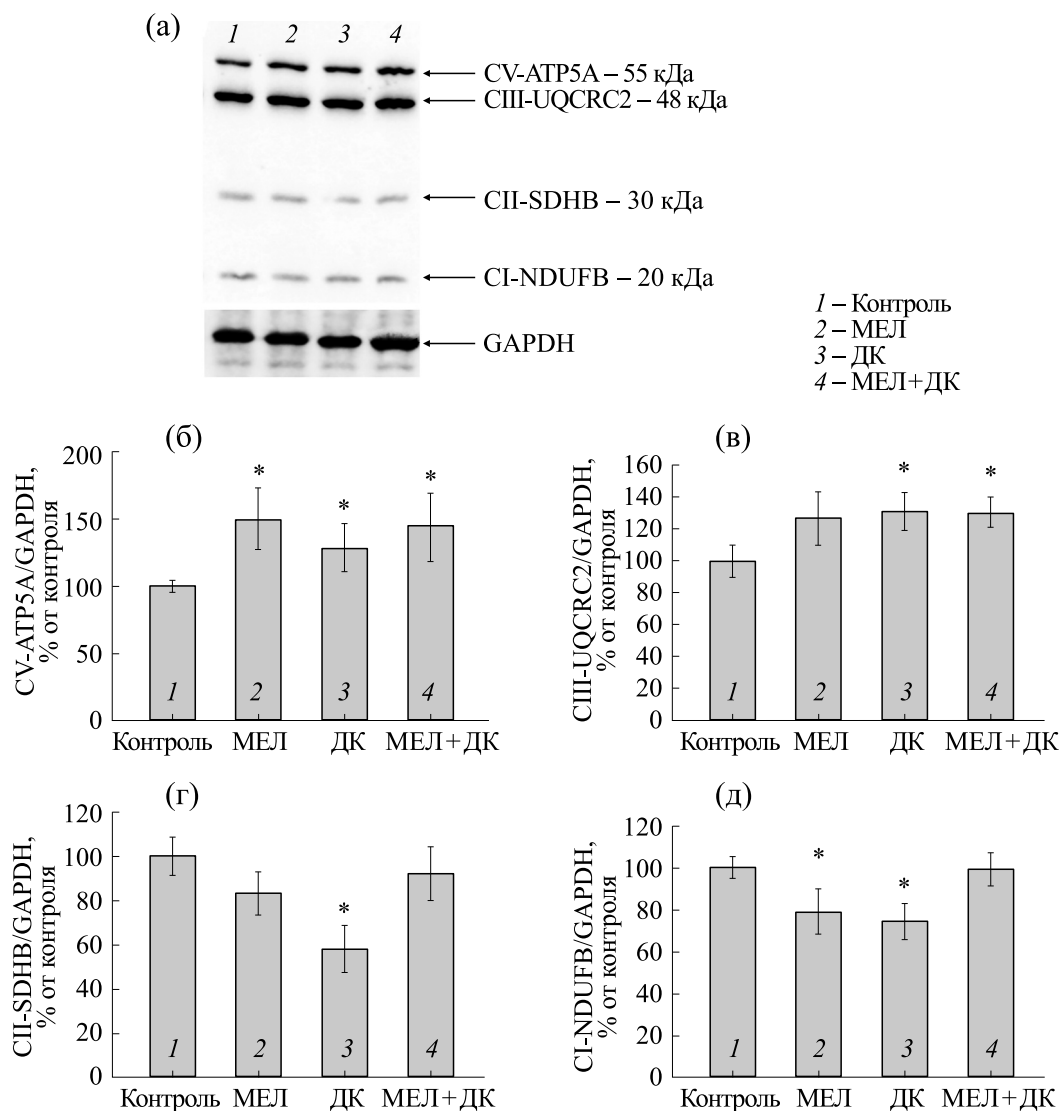


Рис. 4. Влияние мелатонина и ДК на изменение уровней основных субъединиц комплексов дыхательной цепи в клетках нейробластомы мыши N1E-115. GAPDH использовали в качестве контроля белковой нагрузки: (а) — иммуноокрашивание коктейлем антител OXPHOS и GAPDH (контроль белковой нагрузки); (б) — количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии. Данные по трем независимым экспериментам представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0.05$ — достоверное различие по сравнению с контролем.

тонин [17]. В настоящем исследовании, мы выяснили, способны ли ДК и мелатонин, применяемые совместно, усиливать свои действия в клетках нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300). Мы наблюдали, что ДК и мелатонин тормозили пролиферацию как по отдельности, так и совместно, причем совместное использование этих двух препаратов не усиливало торможение пролиферации.

Клеточная дифференцировка представляет собой процесс, в результате которого клетка становится специализированной, т.е. приобретает химические, морфологические и функциональные особенности. Культура клеток нейробласто-

мы мыши N1E-115 (клон С-1300) при определенных условиях способствует дифференцировке нейрона, демонстрирует синтез нейромедиаторов и специфических ферментов, наличие электрической и химической возбудимости [18]. Более того, показано, что мелатонин усиливает клеточную пролиферацию и способствует дифференцировке [7, 19]. В наших экспериментальных условиях мы наблюдали, что как мелатонин, так и ДК усиливали клеточную дифференцировку (рис. 3) по сравнению с контролем, однако при их совместном использовании значения не отличались от контрольных.

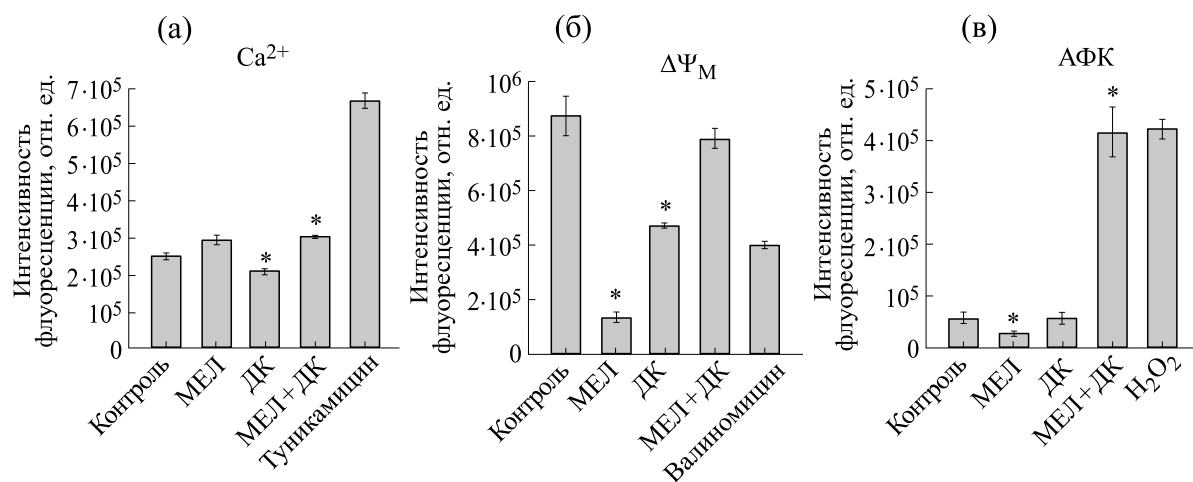


Рис. 5. Влияние мелатонина и ДК на изменение содержания цитозольного Ca^{2+} , митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) и внутриклеточной продукции АФК в клетках нейробластомы мыши N1E-115: (а) — изменение содержания цитозольного Ca^{2+} туникамицин использовали в качестве положительного контроля; (б) — изменение $\Delta\Psi_m$, валиномицин использовали в качестве положительного контроля; (в) — изменение внутриклеточной продукции АФК, H_2O_2 использовали в качестве положительного контроля. Данные по трем независимым экспериментам представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0.05$ — достоверное различие по сравнению с контролем.

Известно, что на изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле активно реагируют различные органеллы клетки, в первую очередь митохондрии [20]. Накопление сверхпорогового Ca^{2+} в матриксе митохондрий может привести к различным нарушениям, таким как снижение мембранного потенциала и повышение продукции АФК, и тем самым вызвать окислительный стресс [21–23]. Сообщалось, что в опухолевых клетках мелатонин инициирует апоптоз и увеличивает клеточное содержание АФК [24, 25], что сопровождается снижением митохондриального потенциала

[26–28]. Согласно полученным результатам, мелатонин повышал содержание цитозольного Ca^{2+} по сравнению с контролем, при этом мы наблюдали драматичное снижение $\Delta\Psi_m$ и снижение АФК в клетках нейробластомы. В этих условиях в присутствии ДК происходило уменьшение цитозольного Ca^{2+} и $\Delta\Psi_m$, тогда как внутриклеточная продукция АФК не отличалась от контроля. Совместное применение мелатонина и ДК приводило к повышению цитозольного Ca^{2+} , снижению $\Delta\Psi_m$ и драматичному повышению продукции

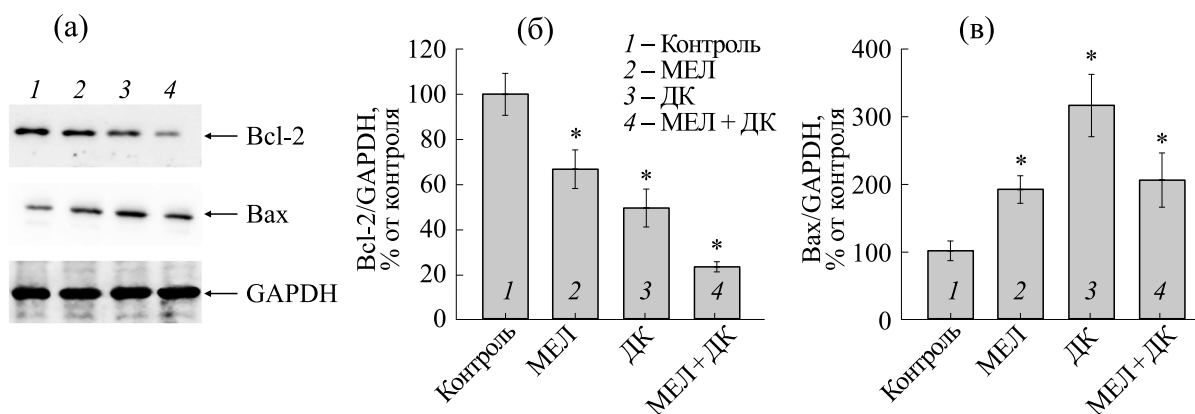


Рис. 6. Влияние мелатонина и ДК на изменение уровней апоптотических белков в клетках нейробластомы мыши N1E-115: (а) — иммуноокрашивание антителами к Bcl-2, Bax и GAPDH (контроль белковой нагрузки); (б) — количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, представленное как соотношение Bcl-2 к GAPDH; (в) — количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, представленное как соотношение Bax к GAPDH. Уровень белка в лизате клеток без каких-либо добавок принимали за 100%. Данные по трем независимым экспериментам представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение, * $p < 0.05$ — достоверная разница по сравнению с контролем.

АФК. По-видимому, повышение содержания Ca^{2+} при комбинированном применении мелатонина и ДК было обусловлено действием мелатонина, тогда как снижение $\Delta\Psi_m$ было менее значительным, чем при действии препаратов по отдельности. Вероятно, механизмы действия мелатонина и ДК по отдельности и при совместном их применении различны.

Как известно, мутации в раковых клетках, затрагивающие субъединицы дыхательной цепи, указывают на центральную роль окислительного фосфорилирования в онкогенезе. Недавние исследования показали, что такие мутации комплексов дыхательной цепи влияют на индукцию апоптоза [29]. Митохондриальная дыхательная цепь состоит из четырех связанных с мембраной мультимерных комплексов и катализирует окисление восстанавливающих эквивалентов, в основном никотинамидадениндинуклеотида (НАДН), используя терминальный акцептор электронов кислород (O_2) во внутренней митохондриальной мембране [30]. Перенос электронов по дыхательной цепи завершается конечным комплексом АТФ-синтазой (комплекс V), который генерирует АТФ. Следует отметить, что утечка электронов может возникать на всем протяжении дыхательной цепи и приводить к образованию АФК. Ингибирование митохондриального дыхания является одной из стратегий по усилению индуцированного лекарственными средствами апоптоза в различных типах раковых клеток [31]. Полученные нами результаты показывают, что содержание субъединицы комплекса V повышалось при действии ДК, мелатонина и при их совместном применении, тогда как уровень субъединицы комплекса III повышался при действии ДК и совместно ДК с мелатонином. ДК ингибировал содержание субъединицы комплекса II, хотя ни мелатонин, ни совместное применение не оказывали влияние на изменение субъединицы комплекса II. Содержание субъединицы комплекса I снижалось в присутствии мелатонина и ДК, но их совместное добавление не отличалось от контроля.

Семейство Bcl-2 представляет собой наиболее охарактеризованное семейство белков, участвующих в регуляции апоптотической гибели клеток, состоящее из антиапоптотических и проапоптотических членов. Это белковое семейство включает как ингибиторы, так и индукторы клеточной гибели. Вместе они регулируют процессы, митохондриального внутреннего апоптоза, приводящие к гибели клеток. Этот путь необходим для нормального эмбрионального развития и для предотвращения рака [32]. Мы исследовали изменение содержания антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического Bax. Согласно полученным результатам как ДК, так и мелатонин по-

вышали содержание Bcl-2, причем их совместное применение усиливало этот эффект. Что касается изменения Bax, то и ДК, и мелатонин повышали содержание Bax, тогда как при их совместном применении усиление эффекта не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили действие ДК, мелатонина и их совместное применение на культуру клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон C-1300). Несмотря на то, что оба препарата ингибируют пролиферацию и усиливают дифференцировку, а также повышают содержание проапоптотического белка и снижают уровень антиапоптотического белка, что предполагает запуск апоптотического каскада, мы наблюдали, что по отдельности эти препараты обладают более сильными эффектами, чем при совместном применении. Мы предполагаем, что поскольку ДК и мелатонин не усиливают действия друг друга, по-видимому, механизмы их действия различны, поэтому их совместное применение в культуре клеток нейробластомы N1E-115 (клон C-1300) нецелесообразно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (№№ 075-01025-23-01 и 075-00957-23-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. C. Matias, T. M. Manieri, S. S. Cipriano, et al., *Toxicol. In Vitro*, **27** (1), 349 (2013).
2. C. I. Nobel, M. Kimland, B. Lind, et al., *J. Biol. Chem.*, **270** (44), 26202 (1995).
3. O. M. Viquez, H. L. Valentine, K. Amarnath, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **229** (1), 77 (2008).
4. C. Liu, Z. Liu, Y. Fang, et al., *Environ. Int.*, **171**, 107696 (2023).
5. M. Solovieva, Y. Shatalin, R. Fadeev, et al., *Biomolecules*, **10** (1), 69 (2020).
6. A. Menendez-Pelaez, R. Reiter, *J. Pineal Res.*, **15** (2), 59 (1993).
7. S. Cos, R. Verduga, C. Fernandez-Viadero, et al., *Neurosci. Lett.*, **216** (2), 113 (1996).

8. Y. Baburina, A. Lomovsky, and O. Krestinina, *J. Pers. Med.*, **11** (4), N274 (2021).
9. A. Lomovsky, Y. Baburina, I. Odinkova, et al., *Antioxidants (Basel)*, **9** (11), (2020).
10. A. I. Lomovsky, Y. L. Baburina, R. S. Fadeev, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **88** (1), 73 (2023).
11. А. И. Ломовский, Ю. Л. Бабурина, М. И. Кобякова и др., *Биол. мембраны*, **37** (2), 103 (2020).
12. О. В. Крестинина, С. Н. Мякишева, Ю. Л. Бабурина и др., *Нейрохимия*, **34** (1), 41 (2017).
13. V. Matranga, D. Oliva, S. Sciarrino, et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, **13** (2), 137 (1993).
14. M. E. Solovieva, Y. V. Shatalin, V. V. Solovyev, et al., *Redox Biol.*, **20**, 28 (2019).
15. I. Ali, W. A. Wani, K. Saleem, and M.-F. Hseih, *Polyhedron*, **56**, 134 (2013).
16. M. Altaf, M. Monim-UI-Mehboob, A. N. Kawde, et al., *Oncotarget*, **8** (1), 490 (2017).
17. W. H. Talib, A. R. Alsayed, A. Abuawad, et al., *Molecules*, **26** (9), 2506 (2021).
18. T. Amano, E. Richelson, and M. Nirenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69** (1), 258 (1972).
19. W. J. Lee, L. C. Chen, J. H. Lin, et al., *Cancer Medicine*, **8** (10), 4821 (2019).
20. C. Giorgi, A. Romagnoli, P. Pinton, and R. Rizzuto, *Curr. Mol. Med.*, **8** (2), 119 (2008).
21. I. Kruman, Q. Guo, and M. P. Mattson, *J. Neurosci. Res.*, **51** (3), 293 (1998).
22. E. N. Maciel, A. E. Vercesi, and R. F. Castilho, *J. Neurochem.*, **79** (6), 1237 (2001).
23. P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero, et al., *Oncogene*, **27** (50), 6407 (2008).
24. D. Lanoix, A. A. Lacasse, R. J. Reiter, and C. Vaillancourt, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **348** (1), 1 (2012).
25. F. Radogna, L. Paternoster, M. De Nicola, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **239** (1), 37 (2009).
26. A. P. Batista, T. G. da Silva, A. Teixeira, et al., *Life Sci.*, **93** (23), 882 (2013).
27. A. P. Batista, T. G. da Silva, A. A. Teixeira, et al., *Micron (Oxford)*, **59**, 17 (2014).
28. I. Bejarano, J. Espino, A. M. Marchena, et al., *Mol. Cell. Biochem.*, **353** (1-2), 167 (2011).
29. A. Lemarie, S. Grimm, *Oncogene*, **30** (38), 3985 (2011).
30. G. Lenaz and M. L. Genova, *Antioxid. Redox Signal.*, **12** (8), 961 (2010).
31. H. Pelicano, L. Feng, Y. Zhou, et al., *J. Biol. Chem.*, **278** (39), 37832 (2003).
32. J. M. Hardwick and L. Soane, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5** (2), a008722 (2013).

Effect of Combined Use of Melatonin and Diethyldithiocarbamate on the N1E-115 Cell Line (a Clone of Cells from Mouse Neuroblastoma C-1300)

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

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

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

A study has been made on the effects of sodium diethyldithiocarbamate and melatonin and their interaction on proliferative activity, the variation in cytosolic Ca^{2+} , membrane potential and reactive oxygen species production in the neuroblastoma N1E-115 cell line (a clone of cells from mouse neuroblastoma C-1300). This study showed that combined use of diethyldithiocarbamates and melatonin inhibited proliferation and enhanced cell differentiation. At the same time, the content of Bcl-2 decreased, while the content of Bax increased, that were likely to trigger an apoptotic cascade. However, the use of these two drugs in combination did not enhance the observed effects. Therefore, this study suggests that the mechanisms by which diethyldithiocarbamates and melatonin act are apparently different.

Keywords: sodium diethyldithiocarbamate, melatonin, proliferation, differentiation, subunits of mitochondrial respiratory chain complexes, production of reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, cytosolic calcium