

Посвящается моему учителю, профессору Г.К. Герасимовой.
Т.А. Сидорова

Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота»

Т.А. Сидорова¹, М.С. Вагида¹, О.Л. Калия², Г.К. Герасимова¹

¹ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация

² ФГУП Государственный научный центр «НИОПИК», 123995, ул. Б. Садовая, д. 1, корп. 4, Москва, Российская Федерация

РЕФЕРАТ

Эффективность нового противоопухолевого средства — бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» [БКС (ТФ+АК)], агента, генерирующего активные формы кислорода, может зависеть от активности ферментов антиоксидантной системы клетки, включая каталазу (САТ). Для выяснения роли САТ в защите опухолевых клеток человека от окислительного стресса, вызванного БКС (ТФ+АК), мы исследовали уровень экспрессии и базальную активность САТ в клетках, ее чувствительность к ингибитору аминотриазолу (3-АТ). Установлено, что в культурах опухолевых клеток человека различного гистогенеза, растущих *in vitro*, конститутивно экспрессируется функционально активная САТ, при этом базальный уровень экспрессии и ее активность зависят от природы клеток. Эффективность угнетения САТ с помощью 3-АТ (величина IC_{50} 3-АТ) одинакова для клеток всех исследованных линий, находится в диапазоне 20–25 мМ и не зависит от уровня экспрессии белка в клетках. У клеток разного гистогенеза не обнаружено прямой корреляции между биологическими характеристиками САТ в опухолевых клетках и их чувствительностью к БКС (ТФ+АК). В условиях фармакологического угнетения САТ цитотоксическая активность БКС (ТФ+АК) возрастает в 2 раза, а степень сенситизации (увеличение чувствительности) опухолевых клеток человека к БКС (ТФ+АК) зависит от их природы.

Ключевые слова: опухолевые клетки человека, БКС (ТФ+АК), окислительный стресс, каталаза, аминотриазол.

Принято в печать: 7 мая 2014 г.

Т.А. Сидорова — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза, tatsid@yahoo.com

М.С. Вагида — младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ Канцерогенеза, vagida@gmail.com

О.Л. Калия — д-р хим. наук, профессор, руководитель лаборатории физической и координационной химии функциональных красителей

Г.К. Герасимова — д-р мед. наук, профессор

Для переписки: Т.А. Сидорова, 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация, tatsid@yahoo.com

Для цитирования: Сидорова Т.А., Вагида М.С., Калия О.Л., Герасимова Г.К. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». Клини. онкогематол. 2014; 7(3): 282–9.

Role of Catalase in Protection of Cancer Cells from Oxidative Stress induced by Binary Catalytic System “Teraphtal + Ascorbic acid”

T.A. Sidorova¹, M.S. Vagida¹, O.L. Kaliya², G.K. Gerasimova¹

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Kashirskoye shosse, 24, Moscow, 115478, Russian Federation

² State Scientific Center NIOPIC, B. Sadovaya str., 1, bld. 4, Moscow, 123995, Russian Federation

ABSTRACT

The efficacy of a novel anti-tumor agent binaric catalytic system “teraphtal + ascorbic acid” [BCS (T+A)], generating reactive oxygen species, may depend on the activity of enzymes of the cellular antioxidant defense system including catalase (CAT). To evaluate the role of CAT in cancer cell defense from oxidative stress induced by BCS (T+A), we studied the following biomarkers: the expression level and basal activity of CAT in cells, and its sensitivity to specific inhibitor, aminotriazole (3-AT). We found that functionally active CAT was expressed constitutively in cultures of human tumor cells of different hystogenesis grown *in vitro*; at that the basal levels of CAT-protein expression and CAT-enzyme activity depend on cell types. The efficacy of CAT inhibiting by 3-AT (the parameter IC_{50} 3-AT) is the same for cells of all tested cultures, it ranges from 20 to 25 mM and does not depend on the level of CAT protein expression in cells. No direct correlation was found between the biological CAT characteristics and their sensitivity to BCS (T+A) for cells of different hystogenesis. In case of pharmacological CAT inhibition, the cytotoxic activity of BCS (T+A) is doubled, whereas the human tumor cell sensitization degree (increased sensitivity) to BCS (T+A) depends on their type.

Keywords: human tumor cells, BCS (T+A), oxidative stress, catalase, aminotriazol.

Accepted: May 07, 2014

T.A. Sidorova — PhD, Leading scientific worker in the laboratory of mechanisms of tumor cell death in the Scientific Research Institute of Carcinogenesis, tatsid@yahoo.com

M.S. Vagida — junior scientific worker in the laboratory of mechanisms of tumor cell death in the Scientific Research Institute of Carcinogenesis, vagida@gmail.com

O.L. Kaliya — DSci, professor, head of laboratory of physical and coordination chemistry of functional dyes, jerrick@cityline.ru

G.K. Gerasimova — DSci, professor

Address correspondence to: T.A. Sidorova, Kashirskoye shosse, 24, Moscow, 115478, Russian Federation, tatsid@yahoo.com

For citation: Sidorova T.A., Vagida M.S., Kaliya O.L., Gerasimova G.K. Role of Catalase in Protection of Cancer Cells from Oxidative Stress induced by Binary Catalytic System "Teraphtal + Ascorbic acid". *Klin. onkogematol.* 2014; 7(3): 282–9. (In Russ.)

ВВЕДЕНИЕ

В клетках млекопитающих в ходе метаболических процессов образуются активные формы кислорода (АФК), такие как супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), радикал гидроксила (OH^{\cdot}) и H_2O_2 . В аэробных условиях основными источниками АФК в нормальных и опухолевых клетках являются комплексы I и III дыхательной цепи митохондрий, ферменты семейства NOX (НАДРН-оксидаза), липооксигеназы, негемовые диоксиоксигеназы, миелопероксидаза, лизилоксидаза, система ксантин/ксантинооксидаза [1]. Количество АФК в клетке возрастает в ответ как на физиологические стимулы (цитокины, факторы роста) [2], так и на внешние воздействия: УФ- [3, 4], γ -облучение [5], фотодинамическая терапия (ФДТ) [6], противоопухолевая химиотерапия [7].

Гиперпродукция АФК может привести к окислительному стрессу в клетках [8, 9], остановке деления и их гибели путем апоптоза [10] или некроза [11]. Для защиты от окислительного стресса в клетке существует мощная антиоксидантная система, включающая как ферменты (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, САТ), так и низкомолекулярные вещества: витамины (С, А, Е), тиолы, глутатион. В антиоксидантной системе клетки каталаза (САТ) является основным ферментом, нейтрализующим H_2O_2 до H_2O . Несмотря на то что в опухолевых клетках различного гистогенеза отмечается низкий уровень экспрессии САТ-белка [12, 13], у млекопитающих выделяются варианты опухолей с высоким уровнем экспрессии белка: острые миелоидные лейкозы [14], глиомы [15, 16]. Цитопротективные свойства САТ требуют функционально-активного фермента. Аминотриазол, 3-амино-1,2,4-триазол (3-АТ), известен как химический ингибитор активности САТ [17]. В условиях фармакологического угнетения САТ наблюдается увеличение чувствительности опухолевых клеток к окислительному стрессу, индуцированному γ -облучением [16], ФДТ [18] и цитотоксинами (H_2O_2 [16], β -амилоид [19], химиопрепараты [20]).

В качестве нового противоопухолевого средства в клинике проходит изучение бинарной каталитической системы «терафтал [4,5-карбоксифталоцианин кобальта] с аскорбиновой кислотой» — БКС (ТФ+АК). Данные II фазы клинических исследований свидетельствуют о недостаточном лечебном эффекте этой системы [21], что заставляет искать дополнительные способы повышения ее эффективности. Поскольку

АФК, как установлено, играют ведущую роль в механизме цитотоксического действия БКС (ТФ+АК) [22], можно предположить, что эффективность БКС (ТФ+АК) будет зависеть от мощности внутриклеточной антиоксидантной системы.

Целью данной работы было выяснить роль САТ в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного БКС (ТФ+АК). Нам предстояло: 1) определить, существует ли связь между чувствительностью опухолевых клеток человека к БКС (ТФ+АК) и биологическими характеристиками САТ в клетках: базальным уровнем экспрессии САТ-белка и величиной базальной активности САТ-фермента; 2) исследовать влияние 3-АТ на функциональную активность САТ в опухолевых клетках человека; 3) оценить эффективность БКС (ТФ+АК) в условиях фармакологического угнетения активности САТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались препараты и химические соединения: акриламид, бис-акриламид, ТЕМЕД, APS, SDS, ЭДТА, ДТТ, PMSF, коктейль ингибиторов, реагент для определения концентрации белка по Бредфорду, BSA, Твин-20, глицин, кумаровая кислота, люминол, МТТ, АК, 3-АТ, H_2O_2 , 2,7-диацетат дихлорфлюоресцеина (DCFH-DA), Hepes, PBS (Sigma); Трис-HCl, Трис-OH, NaCl, ДМСО, NaOH (Roth, Германия), метанол (Merck); терафтал-лио (препарат совместного производства ФГУП ГНЦ «НИОПИК» и ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Россия), адриамицин (Farmitalia-Carlo Erba, Италия), митоксантрон (Jelfa, Польша).

Поликлональные антитела к САТ получены от Merck Bioscience; моноклональные антитела к актину — от Amersham. Иммуноглобулины antirabbit-IgG и anti-mouse-IgG (clone C4) получены от Amersham и Chemicon соответственно. ЕЛС-система приготовлена согласно стандартному протоколу.

Культуры клеток

В исследовании использовали культуры клеток монобластного лейкоза человека линии U937, эритроидного лейкоза человека линии K562, его варианта с индуцированной устойчивостью к доксорубину (K562/4), промиелоцитарного лейкоза линии HL-60, аденокарциномы толстой кишки линии НСТ 116, аденокарциномы ротоглотки линии KB 3-1. Для поддержания

линий и проведения исследований лейкозные клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10% FCS, 2 мМ глутамин и антибиотик (стрептомицин + пенициллин). Клетки, растущие в виде монослоя (НСТ 116 и КВ 3-1), пассировали в среде, содержащей DMEM, 10% FCS, 2 мМ глутамин и антибиотик.

Исследование белков методом Вестерн-блоттинг

Для выделения белков клетки (2×10^6) лизировали в 100 мкл Трис-ЭДТА буфера (pH 7,5), содержащего 20 мМ Трис-ОН, 0,5 мМ ЭДТА, 10 мкл/мл коктейля ингибиторов (1:100), 10 мкл/мл RMSF, при температуре 4 °С в течение 40 мин. Концентрацию белков определяли методом Бредфорда [23], используя в качестве стандарта BSA.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В SDS-ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ И ИММУНОБЛОТТИНГ

Пробы, содержащие 40 мкг каталазы, 20 мкг актина, 5-кратный буфер для нанесения белков на гель (конечная концентрация 1-кратная), ДТТ 1 мМ, прогревали в термостате при 95 °С в течение 5 мин. Разделение белков проводили по методу U.K. Laemmli [24] в 10% SDS-полиакриламидном геле в течение 2 ч при напряжении поля 80 мВ для концентрирующего геля и 100–150 мВ для разделяющего геля. Белки из геля переносили на PVD-мембрану (Amersham) в течение ночи при 4 °С и токе 300 мА. Буфер для переноса содержал 20 % метанола. Мембрану после переноса белков красили раствором Roopco S, блокировали в 5% обезжиренном молоке в 1xTBS-T в течение 40 мин при комнатной температуре. Иммуноблоттинг с первыми антителами проводили в течение ночи при 4 °С на шейкере, трижды отмывали в 15 мл 1xTBS-T в течение 10 мин на шейкере. Со вторыми антителами, мечеными пероксидазой, мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с последующей трехкратной промывкой в 15 мл 1xTBS-T. Все антитела разводили в 5% обезжиренном молоке в 1xTBS-T в конечной концентрации 1:1000 (каталаза, актин) и 1:10 000 (иммуноглобулины).

Мембраны обрабатывали ELC-регентом в течение 1 мин, помещали в слайды, сигналы люминесценции регистрировали с помощью специальной фотопленки Kodak Biomax Light Film (Sigma).

Определение функциональной активности САТ в опухолевых клетках

Функциональную активность САТ в клетках определяли спектрофотометрически с помощью набора реагентов компании Sauman, предназначенных для выявления пероксидазной активности фермента. Для фармакологического угнетения активности САТ использовали 3-АТ, в присутствии которого клетки инкубировали в течение 1 ч в диапазоне концентраций 10–100 мМ. Для получения цитозольной формы САТ клетки дезинтегрировали ультразвуком (установка УРС-1, 20 с, 4 °С) и эту суспензию центрифугировали (13 500 об./мин, 20 мин, 4 °С). В качестве источника САТ использовали супернатант, содержащий 20–40 мкг белка.

Исследование внутриклеточного уровня АФК

Для оценки внутриклеточного базального и индуцированного препаратами уровней АФК использовался краситель DCFH-DA [25]. В день эксперимента клетки рассеивали на 12-луночные планшеты в концентрации $1 \times 10^6/2$ мл питательной среды. Через 6 ч адаптации в соответствующие лунки добавляли 3-АТ (25–100 мМ) инкубировали 60 мин, затем добавляли БКС (ТФ+АК) (25 и 50 мкМ) и H_2O_2 (50 и 100 мкМ) и продолжали инкубацию с H_2O_2 в течение 30 мин, с БКС (ТФ+АК) — 1–2 ч. За 45 мин до окончания инкубации с препаратами добавляли DCFH-DA (10 мкМ). После инкубации суспензию клеток из планшета переносили в эппендорфы, центрифугировали 5 мин при 1800 об./мин и 10 °С, удаляли питательную среду. Клетки промывали 2 мл буфера (20 мМ Hepes в PBS), центрифугировали и ресуспендировали в 0,5 мл буфера. Интенсивность флуоресценции 20 000 клеток регистрировали с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II при λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 530 нм. Результаты представлены в виде интенсивности флуоресценции (средний канал) клеток с учетом соответствующих контрольных величин.

Исследование жизнеспособности опухолевых клеток in vitro МТТ-методом

Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован МТТ-метод [26]. Исходная плотность посева клеток в лунки 96-луночных планшетов была 1×10^4 клеток/200 мкл среды/лунку для линий К562, HL-60, U937) и 5×10^3 клеток/100 мкл среды/лунку для линий НСТ 116, КВ 3-1. Препараты добавляли в среду инкубации через 2 ч после рассеивания суспензионных клеток и через 8–12 ч после распластывания клеток, растущих в виде монослоя (НСТ 116, КВ 3-1). Через 72 ч инкубации клеток с препаратами добавляли МТТ (5 мг/мл). Количество формазана, образованного в живых клетках, определяли с помощью прибора Uniplan (Россия) при длине волны 540 нм. Количественным критерием цитотоксичности препаратов служил индекс IC_{50} , отражающий концентрацию соединений, вызывающих гибель 50 % клеток. За 100 % принимали выживаемость клеток, инкубированных без препаратов (контроль). Величина IC_{50} была определена с помощью метода численных решений по трем экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля первой производной экспериментальной кривой выживаемости клеток. В цитотоксических экспериментах для оценки эффективности 3-АТ в качестве ингибитора САТ в комбинации с препаратами использован индекс сенситизации (IS):

$$IS = IC_{50} (3-AT + препарат) / IC_{50} (препарат).$$

Величина $IS \leq 0,5$ в присутствии нетоксических концентраций 3-АТ (выживаемость клеток не менее 80 % по сравнению с контрольными) свидетельствовала о взаимодействии препаратов по типу синергизма.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prism. Статистическая значимость различий определялась с использованием непараметрического *t*-критерия, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование цитотоксической активности БКС (ТФ+АК) на опухолевых клетках человека

Цитотоксичность БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 (в качестве стандартного представителя АФК) была изучена для опухолевых клеток различного гистогенеза: монобластного лейкоза линии U937, эритроидного лейкоза линии K562 и его варианта с фенотипом множественной лекарственной устойчивости (K562/4), промиелоцитарного лейкоза линии HL-60, аденокарциномы толстой кишки линии НСТ 116 и аденокарциномы ротоглотки линии KB 3-1. IC_{50} — количественный критерий цитотоксической активности препаратов был определен с помощью МТТ-метода (см. «Материалы и методы»). Результаты исследований представлены в табл. 1.

Согласно данным, представленным в табл. 1, величина IC_{50} БКС (ТФ+АК) для опухолевых клеток исследованных линий находится в диапазоне концентраций 20–85 мкМ. Для этих же линий клеток величина IC_{50} H_2O_2 колеблется в более широком диапазоне — 22–800 мкМ. При этом цитотоксическая активность H_2O_2 у лейкозных клеток сопоставима с таковой у БКС (ТФ+АК) (IC_{50} H_2O_2 22–125 мкМ), в то же время клетки аденокарциномы (НСТ 116, KB 3-1) оказались более устойчивыми к H_2O_2 (IC_{50} H_2O_2 200–800 мкМ) по сравнению с БКС (ТФ+АК). Таким образом, мы отмечаем, что чувствительность как к БКС (ТФ+АК), так и к H_2O_2 может зависеть от природы опухолевых клеток.

Исследование базального уровня экспрессии САТ-белка в опухолевых клетках

Для выяснения роли САТ в защите опухолевых клеток от токсического воздействия БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 мы исследовали эндогенный уровень экспрессии этого белка в клетках (рис. 1).

Как видно на рис. 1, в клетках всех 6 линий опухолевых клеток человека выявляется базальный уровень экспрессии цитозольной формы САТ-белка. Уровень экспрессии белка в клетках мы условно разделили на высокий (+++), средний (++) и низкий (+). Высокий уровень экспрессии САТ обнаружен в лейкозных клетках линий U937, K562 и K562/4; средний — в промиелоцитах линии HL-60 и клетках аденокарциномы KB 3-1. Клетки аденокарциномы толстой кишки линии НСТ 116 обладают низким уровнем экспрессии САТ. Таким образом, величина эндогенной экспрессии САТ зависит от типа клеток.

Защищает ли высокий уровень экспрессии САТ в опухолевых клетках от токсического влияния БКС (ТФ+АК)? Сопоставляя уровень экспрессии белка в клетках разного гистогенеза с их чувствительностью (величина IC_{50}) к БКС (ТФ+АК), отмечаем, что клетки с высоким уровнем

Таблица 1. Цитотоксическая активность БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 у опухолевых клеток с разным уровнем экспрессии САТ-белка

Линия клеток	Тип	IC_{50} , мкМ		Базальный уровень экспрессии САТ, у.е.
		БКС (ТФ+АК)	H_2O_2	
U937	Монобластный лейкоз	73,5 ± 3,5	90,6 ± 11,2	+++
K562	Эритроидный лейкоз	46,8 ± 5,2	63,2 ± 12	+++
K562/4	Эритроидный лейкоз	25,0 ± 5,1	23,5 ± 3,5	+++
HL-60	Промиелоцитарный лейкоз	35,2 ± 3,6	62,0 ± 2,3	++
KB 3-1	Аденокарцинома ротоглотки	56,3 ± 12,3	476,7 ± 163,3	++
НСТ 116	Аденокарцинома толстой кишки	29,0 ± 6,4	210,5 ± 14,1	+

ПРИМЕЧАНИЕ. Данные получены из 3–5 независимых экспериментов и представлены в виде среднего (\pm SD). у.е. — условные единицы.

экспрессии САТ (U937, K562, K562/4) различаются по чувствительности к БКС (ТФ+АК) в 2–3 раза (рис. 2; см. табл. 1).

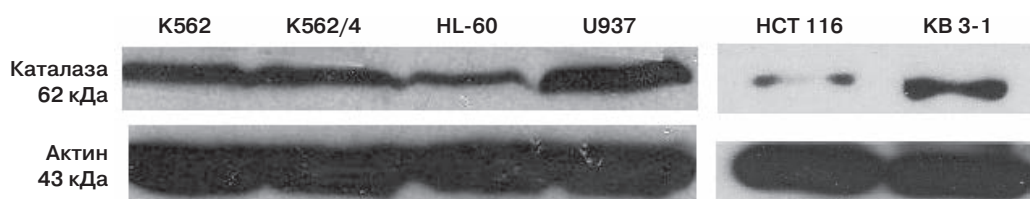
Неожиданно выяснилось, что клетки с низким уровнем экспрессии САТ (НСТ 116) оказались гораздо устойчивее (в 3–8 раз) к H_2O_2 , чем клетки с высоким содержанием САТ (U937, K562, K562/4) (см. табл. 1). Таким образом, мы не обнаружили прямой корреляции между уровнем экспрессии САТ в клетках и их чувствительностью к АФК-генерирующим агентам — БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 .

Данные литературы о роли САТ-белка в защите клеток от окислительного стресса противоречивы. С одной стороны, высокий (эндогенный и приобретенный путем трансфекции) уровень экспрессии САТ-белка в опухолевых клетках прямо коррелирует с их устойчивостью к АФК-генерирующим агентам [27–31]. С другой стороны, устойчивость к окислительному стрессу опухолей может наблюдаться на фоне низкого уровня экспрессии САТ в клетках [32, 33].

Исследование функциональной активности САТ-фермента в опухолевых клетках человека *in vitro*: 3-АТ как фармакологический ингибитор активности САТ

Каталитическая и пероксидазная активности САТ неразрывно связаны друг с другом и зависят только от источника и концентрации доноров водорода [17].

В данном исследовании для оценки функциональной активности САТ была выбрана пероксидазная активность [34]. В системе *in vitro* в клетках 5 линий определили базальную активность фермента и влияние на величину этого параметра 3-АТ, известного ингибитора САТ.

**Рис. 1.** Базальный уровень экспрессии каталазы в опухолевых клетках человека *in vitro*

U937 — культура линии клеток монобластного лейкоза человека; KB 3-1 — культура линии клеток аденокарциномы ротоглотки; K562 — культура линии клеток эритроидного лейкоза человека; HL-60 — культура линии клеток промиелоцитарного лейкоза; K562/4 — культура линии клеток эритроидного лейкоза человека с индуцированной устойчивостью к доксорубину; НСТ 116 — культура линии клеток аденокарциномы толстой кишки.



Рис. 2. Цитотоксическая активность БКС (ТФ+АК) для опухолевых клеток человека с разным уровнем базальной экспрессии САТ в клетках

U937 — культура линии клеток монобластного лейкоза человека; KB 3-1 — культура линии клеток аденокарциномы ротоглотки; K562 — культура линии клеток эритроидного лейкоза человека; HL-60 — культура линии клеток промиелоцитарного лейкоза; K562/4 — культура линии клеток эритроидного лейкоза человека с индуцированной устойчивостью к доксорубицину; HCT 116 — культура линии клеток аденокарциномы толстой кишки.

По нашим данным, представленным в табл. 2, САТ, экспрессированная в опухолевых клетках человека, обладает функциональной активностью. Величина базальной активности САТ в клетках колеблется в диапазоне 15–60 нмоль формальдегида/мин/мг белка. Активность фермента является клеточно-специфичной: низкая (15–25 нмоль формальдегида/мин/мг белка) величина отмечается как в лейкозных клетках (HL-60), так и в клетках аденокарциномы толстой кишки (HCT 116).

Известно, что 3-АТ является ингибитором каталитической активности САТ в клетках млекопитающих, особенности механизма действия которого подробно описаны в ряде работ [35–39]. Нам предстояло выяснить, влияет ли 3-АТ на базальную активность САТ в опухолевых клетках человека, растущих *in vitro*.

Согласно нашим данным, представленным на рис. 3, функциональная активность САТ опухолевых клеток снижается после воздействия на них 3-АТ в течение 1 ч. В этих экспериментальных условиях величина IC₅₀ 3-АТ (концентрация ингибитора, при которой достигается угнетение активности фермента на 50 % от базального уровня) для клеток 5 линий (U937, K562, K562/4, HL-60, HCT 116) одинакова и составляет 20–25 мМ.

Данные литературы также свидетельствуют о низком сродстве 3-АТ к САТ у млекопитающих (IC₅₀ 3-АТ 20–40 мМ), а величина этого параметра не зависит от типа

Таблица 2. Ферментативная (пероксидазная) активность САТ опухолевых клеток человека с разным уровнем экспрессии белка

Линия клеток	Активность САТ, нмоль формальдегида/мин/мг белка	Базальный уровень экспрессии САТ, у.е.
U937	46,6 ± 2,5	+++
K562	57,3 ± 4,8	+++
K562/4	40,2 ± 3,2	+++
HL-60	23,3 ± 1,1	++
HCT 116	16,0 ± 1,5	+

* $p < 0,05$.

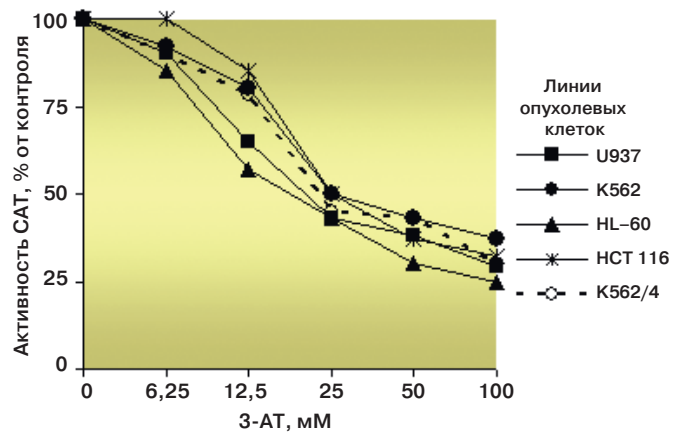


Рис. 3. Влияние 3-АТ на активность САТ в опухолевых клетках человека (данные представлены как средние из двух независимых экспериментов)

U937 — культура линии клеток монобластного лейкоза человека; K562 — культура линии клеток эритроидного лейкоза человека; HL-60 — культура линии клеток промиелоцитарного лейкоза; HCT 116 — культура линии клеток аденокарциномы толстой кишки; K562/4 — культура линии клеток эритроидного лейкоза человека с индуцированной устойчивостью к доксорубицину.

клеток [18, 27, 38]. При инкубации клеток в течение 1 ч с 3-АТ при концентрации ингибитора свыше 50 мМ максимальная степень угнетения активности САТ составляет 70 % от базального уровня активности фермента (см. рис. 2). Дальнейшее угнетение активности САТ требует более длительного времени инкубации с ингибитором [33], но в условиях *in vitro* достичь полного угнетения САТ не удается [36, 37].

Таким образом, САТ в опухолевых клетках 5 линий обладает ферментативной активностью и 3-АТ является ингибитором ее базальной активности. Важна ли ферментативная активность САТ для защиты клеток от окислительного стресса? Сопоставляя величину базальной активности САТ в клетках с их чувствительностью к прооксидантам (см. табл. 1), видно, что клетки с низкой активностью САТ (HCT 116) могут быть более устойчивыми к H₂O₂ по сравнению с клетками с высокой активностью фермента (U937, K562). Действительно, у опухолевых клеток различного гистогенеза базальный уровень функциональной активности САТ не влияет на их чувствительность к АФК-генерирующим агентам [40]. С другой стороны, данные, полученные на сублиниях (клетках одного и того же происхождения), свидетельствуют о том, что САТ-фермент играет роль в защите клеток от окислительного стресса. Так, по сравнению с родительскими клетками трансформированные фибробласты сирийского хомячка приобретают фенотип, в котором высокая функциональная активность САТ прямо коррелирует с «многократной» устойчивостью к H₂O₂ [41, 42]. В ответ на УФ-воздействие получена сублиния лимфобластов с низкой активностью САТ и высокой чувствительностью к оксидантам [43]. Высокая активность САТ в клетках коррелирует с их чувствительностью к АФК-генерирующим агентам линий миеломы человека [44, 45]. В нашей работе для сублиний бластных клеток эритроидного лейкоза человека отмечается, что снижение базальной активности САТ (в 1,5 раза) в клетках K562/4 с фенотипом МЛУ сопровождается увеличением (в

2 раза) чувствительности клеток к БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 по сравнению с клетками родительской линии K562 (см. табл. 1 и 2). Тем не менее вопрос о роли САТ-фермента в защите клеток от окислительного стресса остается открытым, поскольку выживание клеток в этих условиях будет зависеть от многих факторов, обеспечивающих поддержание внутри клетки баланса окислителей-восстановителей.

Преинкубация опухолевых клеток с 3-АТ вызывает их последующую сенситизацию к БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 , но не к адриамицину и митоксантрон

Повлияет ли снижение базальной активности САТ, которое достигается в присутствии 3-АТ, на чувствительность опухолевых клеток к БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 ?

Чтобы исключить вклад самого 3-АТ в эффект комбинации с прооксидантами, мы предварительно определили токсичность самого ингибитора 3-АТ для клеток.

В табл. 3 представлены IC_{50} 3-АТ у опухолевых клеток человека разных линий.

По нашим данным, выживаемость опухолевых клеток человека в присутствии 3-АТ не изменяется вплоть до концентрации 25 мМ, соответствующей величине IC_{50} 3-АТ-ингибитора для фермента. Обращаем внимание на тот факт, что клетки промиелоцитарного лейкоза линии HL-60 и аденокарциномы линии KB 3-1 оказались более устойчивыми по сравнению с клетками других линий (выживаемость 80 % наблюдается вплоть до 75 мМ 3-АТ). К сожалению, наши данные о цитотоксичности 3-АТ, полученные с помощью МТТ-метода, невозможно сопоставить с данными литературы. Как правило, авторы определяют токсичность 3-АТ при краткосрочных (до 24 ч) воздействиях, которые требуют высоких концентраций агентов, генерирующих АФК, и иных методов оценки токсичности (выброс ЛДГ, падение пула АТФ, выживаемость колоний). Сообщается, что чувствительность опухолевых клеток млекопитающих к 3-АТ зависит от типа клеток, а цитотоксичность ингибитора колеблется в диапазоне концентрации от 10 (лимфома мышей сублинии L5178Y) [46] до 100 мМ (миелома мышей линии SP2/0-Ag-14) [20].

По данным литературы, снижение активности САТ после преинкубации клеток с 3-АТ может как сопровождаться их сенситизацией к окислительному стрессу [27, 47], так и не влиять на чувствительность клеток к оксидантам [48].

Для экспериментов с фармакологическим ингибированием САТ мы использовали 3-АТ в широком диапазоне концентраций, которые были нетоксическими (≥ 80 % живых клеток) для каждой линии. Согласно нашим данным, представленным в табл. 4, в условиях

фармакологического угнетения САТ цитотоксичность БКС (ТФ+АК) может как увеличиваться (в 2 раза) у опухолевых клеток человека (линии U937, HL-60, K562, K562/4, KB 3-1), так и не изменяться (НСТ 116). Величина $IS \leq 0,5$ в присутствии нетоксических концентраций 3-АТ свидетельствует о взаимодействии препаратов по типу синергизма.

Обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от других линий в клетках линии промиелоцитарного лейкоза HL-60 сенситизация клеток требует более высокой концентрации 3-АТ (50 мМ), чем ожидали, исходя из величины IC_{50} 3-АТ для САТ-фермента этих клеток (20 мМ) (см. рис. 3). Причина сдвига сенситизирующей концентрации 3-АТ вправо может быть связана с особенностями этих клеток (участие САТ в пролиферации клеток [49]), присутствием другого фермента — миелопероксидазы, чувствительной к 3-АТ [50], которая в условиях цитотоксических экспериментов (72 ч инкубации) может конкурировать за 3-АТ и тем самым снижать эффективность угнетения САТ. Использование специфического ингибитора миелопероксидазы позволит решить вопрос о ее роли в этом феномене. Отсутствие сенситизации клеток аденокарциномы НСТ 116 в условиях фармакологического угнетения САТ с помощью 3-АТ нельзя исключить наряду с другими факторами с низким содержанием эндогенной САТ (см. рис. 1) и низкой базальной активностью САТ-фермента (см. табл. 2).

По нашим (непредставленным) данным, снижение активности САТ после преинкубации опухолевых клеток человека с 3-АТ не влияет на цитотоксичность противоопухолевых препаратов, генерирующих АФК (митоксантрон, адриамицин), что согласуется с данными литературы [47, 51].

Фармакологическое угнетение САТ с помощью 3-АТ увеличивает концентрацию АФК в лейкозных клетках человека

Воздействие на клетки прооксидантов, как известно, приводит к генерации АФК, внутриклеточный уровень которых дополнительно возрастает после угнетения функциональной активности САТ [30]. По нашим данным, в присутствии 3-АТ (50 мМ) уровень АФК в бластных клетках человека при эритроидном лейкозе линии K562/4 после воздействия на них БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 возрастает на 50 % (рис. 4).

В зависимости от природы вещества, время необходимое для регистрации прироста в клетках АФК после воздействия на них прооксидантов, было различным. У «грубого» агента (H_2O_2) изменения возникали при

Таблица 4. Сенситизация опухолевых клеток человека к БКС (ТФ+АК) и H_2O_2 в условиях фармакологического угнетения САТ с помощью 3-АТ

Линия клеток	IS					
	БКС (ТФ+АК)			H_2O_2		
	3-АТ, мМ			3-АТ, мМ		
	12,5	25	50	12,5	25	50
U937	0,5	0,5	Токсично	0,5	0,5	Токсично
K562	0,5	0,5	Токсично	0,5	0,5	Токсично
K562/4	0,5	0,5	Токсично	0,5	0,5	Токсично
HL-60	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	Токсично
НСТ 116	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
KB 3-1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

IS — индекс сенситизации (повышения чувствительности).

Таблица 3. Цитотоксическая активность 3-АТ относительно опухолевых клеток человека разного гистогенеза (данные представлены как среднее из двух независимых экспериментов)

Линии клеток	IC_{50} 3-АТ, мМ
U937	35
K562	40
K562/4	40
HL-60	86
НСТ 116	60
KB 3-1	> 50

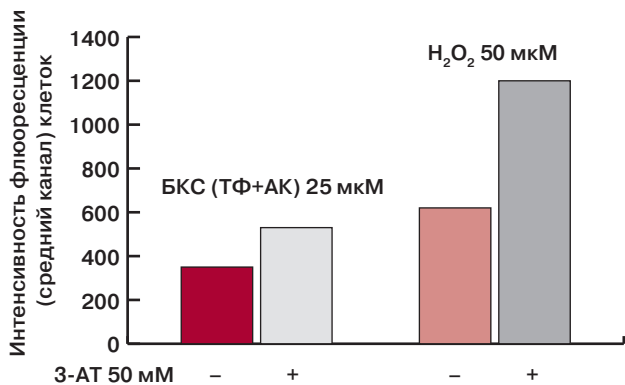


Рис. 4. Влияние 3-АТ на способность БКС (ТФ+АК) и H₂O₂ индуцировать АФК в лейкозных клетках человека линии K562/4. Условия эксперимента: клетки инкубировали в течение 1 ч, затем вносили препараты и продолжали инкубацию с H₂O₂ в течение 30 мин, с БКС (ТФ+АК) — 2 ч. Данные получены из 3 независимых экспериментов и представлены как (M ± m)

кратковременном воздействии на клетки (30 мин), для БКС (ТФ+АК) требовалась более длительная инкубация клеток с препаратом (2 ч).

Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях фармакологического угнетения САТ в опухолевых клетках человека происходит дополнительное увеличение АФК в присутствии ингибитора, что, по-видимому, и способствует сенситизации клеток к прооксидантам БКС (ТФ+АК) и H₂O₂.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в опухолевых клетках человека различного гистогенеза, растущих *in vitro*, конститутивно экспрессируется функционально активная САТ, при этом базальный уровень экспрессии САТ и ее активность зависят от природы клеток. Эффективность ингибитора 3-АТ у САТ-фермента (IC₅₀ 3-АТ) одинакова для клеток всех исследованных линий, находится в диапазоне 20–25 мМ и не зависит от уровня экспрессии САТ в клетках.

У клеток разного гистогенеза не обнаружено прямой корреляции между биологическими характеристиками САТ в опухолевых клетках и их чувствительностью к БКС (ТФ+АК). Можно ли рассматривать низкий уровень экспрессии САТ в сочетании с ее низкой функциональной активностью благоприятными параметрами для реализации цитотоксического эффекта БКС (ТФ+АК) в опухолевых клетках млекопитающих, необходимо выяснить в дальнейшем.

В условиях фармакологического угнетения САТ цитотоксическая активность БКС (ТФ+АК) возрастает в 2 раза, степень сенситизации опухолевых клеток человека к БКС (ТФ+АК) зависит от природы клеток. Эти данные могут свидетельствовать о том, что САТ играет роль в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного БКС (ТФ+АК). Низкая токсичность 3-АТ и длительность ингибирования САТ в организме млекопитающих [52] позволяют рекомендовать комбинацию БКС (ТФ+АК) с 3-АТ на моделях перевиваемых опухолей мышей с целью усилить эффективность каталитической системы. Наше внимание также привлекли данные о том, что широко применяемая в онкогематологии гидроксимочевина оказалась ингибитором функциональной активности САТ [53]. Отсюда возникает вопрос: можно

ли гидроксимочевину комбинировать с препаратами мышьяка для лечения промиелоцитарного лейкоза?

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках договоров с Государственным научным центром «НИОПИК» № 21/08-12-тем.-М по теме: «Клинические испытания и экспериментальное изучение бинарной каталитической системы Терафтал + аскорбиновая кислота БК (ТФ+АК) для терапии злокачественных опухолей».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Paletta-Silva R., Rocco-Machado N., Meyer-Fernandes J.R. NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 3683–704.
 2. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012; 24(5): 981–90.
 3. Peus D., Vasa R.A., Meves A. et al. H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 110(6): 966–71.
 4. Heck D., Vetrano A., Mariano T. et al. UVB light stimulates production of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(25): 22432–6.
 5. Saran M., Bors W. Radiation chemistry of physiological saline reinvestigated: evidence that chloride-derived intermediates play a key role in cytotoxicity. *Radiat. Res.* 1997; 147(1): 70–7.
 6. Buettner G.R., Need M.J. Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer Lett.* 1985; 25(3): 297–304.
 7. Arrick B.A., Griffo W., Cohn Z., Nathan C. Hydrogen peroxide from cellular metabolism of cystine. A requirement for lysis of murine tumor cells by verolepin, a glutathione-depleting antineoplastic. *J. Clin. Invest.* 1985; 76(2): 567–74.
 8. Valko M., Leibfriz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39(1): 44–84.
 9. Cadenas E., Davies K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29: 222–30.
 10. Zhuang S., Yan Y., Daubert R.A. et al. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2007; 292(1): 440–7.
 11. Choi K., Kim J., Kim G.W., Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr. Neurovasc. Res.* 2009; 6(4): 213–22.
 12. Marklund S.L., Westman N.G., Lundgren E., Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 1982; 42(5): 1955–61.
 13. Chung-man Ho J., Zheng S., Comhair S.A. et al. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(23): 8578–85.
 14. Luczak M., Kazmierczak M., Handschuh L. et al. Comparative proteome analysis of acute myeloid leukemia with and without maturation. *J. Proteomics* 2012; 75(18): 5734–48.
 15. Zhong W., Yan T., Lim R., Oberley L.W. Expression of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in glioma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27: 1334–45.
 16. Smith P.S., Zhao W., Spitz D.R., Robbins M.E. Inhibiting catalase activity sensitizes 36 B10 rat glioma cells to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 42(6): 787–97.
 17. Margoliash E., Novogrodsky A. A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochem. J.* 1958; 68(3): 468–75.
 18. Shevchuk I.N., Chekulayeva L.V., Chekulayev V.A. Active oxygen intermediates in the degradation of hematoporphyrin derivative in tumor cells subjected to photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* 2008; 93(2): 94–107.
 19. Milton N.G. Inhibition of catalase activity with 3-amino-triazole enhances the cytotoxicity of the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Neurotoxicology* 2001; 22(6): 767–74.
 20. Wagner B.A., Evig C.B., Reszka K.J. et al. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 440(2): 181–90.
 21. Манзюк Л.В., Бредер В.В., Гершанович Л.М. и др. Результаты I-II фазы клинических испытаний каталитической системы «Терафтал + аскорбиновая кислота». *РБЖ* 2005; 1(4): 105–7.
- [Manzjuk L.V., Breder V.V., Gershanovich L.M. et al. Results of I-II phases of clinical trials of the catalytic system 'teraphtal + ascorbic acid'. *RBZh* 2005; 1(4): 105–7. (In Russ.).]

22. Петрова Е.Г., Борисенкова С.А., Калия О.Л. Окисление аскорбиновой кислоты в присутствии фталоцианиновых комплексов металлов и химические аспекты. Сообщение 2. Катализ октакарбокситфалоцианином кобальта. Продукты реакции. Известия АН (Серия химическая). 2004; 10: 2224–7.
- [Petrova E.G., Borisenkova S.A., Kaliya O.L. Oxidation of ascorbic acid in presence of phthalocyanine complexes of metals and chemical aspects. Report 2. Catalysis of cobalt with octacarboxy phthalocyanine. Reaction products. *Izvestiya AN* (Chemical series). 2004; 10: 2224–7. (In Russ.).]
23. Bradford M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248–54.
24. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–5.
25. Ardestani A., Yazdanparast R., Nejad A.S. 2-Deoxy-D-ribose-induced oxidative stress causes apoptosis in human monocytic cells: prevention by pyridoxal-5-phosphate. *Toxicol. In Vitro.* 2008; 22(4): 968–79.
26. Cole S.P. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1986; 17: 259–63.
27. Gaspar T., Domok F., Lenti L. et al. Neuroprotective effect of adenoviral catalase gene transfer in cortical neuronal cultures. *Brain Res.* 2009; 1270: 1–9.
28. Chilumuri A., Odell M., Milton N. The neuroprotective role of catalase overexpression in SH-SY5Y cells against beta-amyloid and H₂O₂ toxicity. *Alzheimer's Dementia.* 2013; 9(4 Suppl.): 6.
29. Bai J., Cederbaum A.I. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents agents by accelerating the degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 4660–7.
30. Smith P.S., Zhao W., Spitz D.R., Robbins M.E. Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 42: 787–97.
31. Glorieux C., Dejeans N., Sid B. et al. Catalase overexpression in mammary cancer-cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2011; 82: 1384–90.
32. Ho J.C., Zheng S., Comhair S.A. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 8578–85.
33. Coursin D.B., Cihla H.P., Sempf J. et al. An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol. Histopathol.* 1996; 11(4): 851–60.
34. Oshino N., Oshino R., Chance B. The characteristics of the "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation. *Biochem. J.* 1973; 131(3): 555–63.
35. Margoliash E., Novogrodsky A. A study of catalase by 3-amino-1:2:4-triazole. *Biochem. J.* 1958; 68: 468–75.
36. Margoliash E., Novogrodsky A., Schejter A. Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem. J.* 1960; 74: 339–48.
37. Kinnula V.L., Everitt J.J., Mangum J.B. et al. Antioxidant defense mechanisms in cultured pleural mesothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992; 7(1): 95–103.
38. Switala J., Loewen C. Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 401: 145–54.
39. Williams R.N., Delamere N.A., Paterson C.A. Inactivation of catalase with 3-amino-1,2,4-triazole: an indirect irreversible mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 1985; 34(18): 3386–9.
40. Nathan C.F., Arrick B.A., Murray H.W. et al. Tumor cell anti-oxidant defenses. Inhibition of the glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1981; 153(4): 766–82.
41. Кашкина Л.М., Матвеева В.А., Дьякова Н.А. и др. Приобретение НР-фенотипа и изменение активности каталазы в трансформированных клетках различного происхождения в динамике опухолевой прогрессии *in vivo*. ДАН 2003; 394: 830–4.
- [Kashkina L.M., Matveeva V.A., D'yakova N.A. et al. Acquisition of HP-phenotype and changes in the activity of catalase in transformed cells of different origin in dynamics of tumor progression *in vivo*. *DAN* 2003; 394: 830–4. (In Russ.).]
42. Deichman G.I., Kashkina L.M., Mizerina O.A. et al. Mechanisms of unusually high antioxidant activity of RSV-SR-transformed cells and of its suppression by activated p21ras. *Int. J. Cancer.* 1996; 66(6): 747–52.
43. Szumiel I. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: general characteristics. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005; 81(5): 339–52.
44. Wang W., Adachi M., Kawamura R. et al. Parthenolide-induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity. *Apoptosis* 2006; 11(12): 2225–35.
45. Klingelhofer C., Kammerer U., Koospal M. et al. Natural resistance to unusually high induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *BMC Complem. Alter. Med.* 2012; 12: 61.
46. Bouzyk E., Iwanenko T., Jarocewicz N. et al. Antioxidant defense system in differentially hydrogen peroxide sensitive L5178Y sublines. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22(4): 697–704.
47. Kinnula K., Linnainmaa K., Raivio K.O., Kinnula V.L. Endogenous anti-oxidant enzymes and glutathione S-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity. *Br. J. Cancer.* 1998; 77(7): 1097–102.
48. Hata Y., Kawabe T., Hiraishi H. et al. Antioxidant defenses of cultured colonic epithelial cells against reactive oxygen metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 321(1): 113–9.
49. Hachiya M., Akashi M. Catalase regulates cell growth in HL60 human promyelocytic cells: evidence for growth regulation by H₂O₂. *Radiat. Res.* 2005; 163(3): 271–82.
50. Myzak M.C., Carr A.C. Myeloperoxidase-dependent caspase-3 activation and apoptosis in HL-60 cells: protection by the antioxidants ascorbate and (dihydro)lipoic acid. *Redox. Rep.* 2002; 7(1): 47–53.
51. Duthie S.J., Grant M.H. The role of reductive and oxidative metabolism in the toxicity of mitoxantrone, adriamycin and menadione in human liver derived Hep G2 hepatoma cells. *Br. J. Cancer* 1989; 60(4): 566–71.
52. Heim W.G., Appleman D., Pyfrom H.T. Production of catalase changes in animals with 3-amino-1,2,4-triazole. *Science* 1955; 122(3172): 693–4.
53. Juul T., Malolepszy A., Dybkaer K. et al. The *in vivo* toxicity of hydroxyurea depends on its direct target catalase. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(28): 21411–5.

