

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гемоксигеназа-1/ферритин в защите лейкозных клеток от окислительного стресса, индуцированного каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота»

Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, Д.А. Хоченков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

РЕФЕРАТ

Обоснование. Известно, что механизм цитотоксического действия противоопухолевого средства — каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» (ТФ+АК) — связан с образованием в клетке активных форм кислорода (ROS) и индукцией в ней окислительного стресса. Система «гемоксигеназа-1/ферритин» (HO-1/Ft) защищает клетки от окислительного стресса.

Цель. Исследовать значение системы HO-1/Ft в защите лейкозных клеток от токсического воздействия противоопухолевого средства ТФ+АК.

Материалы и методы. В работе использовались лейкозные клетки человека линий K562 и U937. Базальную и препарат-индуцированную экспрессию HO-1/Ft на уровне мРНК и белка изучали методами ОТ-ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга, концентрацию ROS в клетках — методом проточной цитометрии, цитотоксичность препаратов — методом МТТ.

Результаты. По нашим данным, в миеломонобластах линии U937 присутствует конститутивно-активная HO-1, а в эритробластах линии K562 экспрессия этого белка заблокирована на уровне мРНК. Гемин, агонист HO-1, индуцирует в клетках U937 коэкспрессию HO-1 и Ft на уровне мРНК и белка. Активация системы HO-1/Ft гемином в клетках U937 не влияет на чувствительность их к ТФ+АК и увеличивает чувствительность, например, к цитарабину в 2 раза. Установлено, что система ТФ+АК вызывает up-регуляцию генов HO-1/Ft, экспрессия которых увеличивается в 4 и 1,5 раза соответственно по сравнению с базальным уровнем. Предынкубация миеломонобластов U937 с хелатором железа дефероксаминном приводит к увеличению их устойчивости к ТФ+АК в 2 раза. В то же время в присутствии железосодержащего аналога ТФ цитотоксичность этой системы увеличивается в 2 раза.

Заключение. В лейкозных клетках линии U937 с конститутивно-активной системой HO-1/Ft гем-зависимый путь ее активации не играет существенной роли в за-

EXPERIMENTAL STUDIES

Heme Oxygenase-1/Ferritin in Protection of Leukemia Cells from Oxidative Stress Induced by Catalytic System “Teraphtal + Ascorbic Acid”

TA Sidorova, OO Ryabaya, AA Prokof'eva, DA Khochenkov

NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

ABSTRACT

Background. As is well known, cytotoxic mechanism of anti-tumor agent, i.e. catalytic system “teraphtal + ascorbic acid” (“TF+AA”), is associated with production of reactive oxygen species (ROS) and induction of oxidative stress in it. The “heme oxygenase-1/ferritin” (HO-1/Ft) system contributes to antioxidant defense.

Aim. To analyze HO-1/Ft value in protection of leukemia cells from toxicity induced by antitumor agent “TF+AA”.

Materials & Methods. The study was based on human leukemia cell lines K562 and U937. HO-1/Ft basal and drug-induced expression on mRNA and protein levels was analyzed by real-time RT-PCR and Western blot, ROS concentration in cells was determined by flow cytometry, and drug cytotoxicity was measured by MTT assay.

Results. Our data showed constitutively active HO-1 in U937 myelomonoblasts whereas in K562 erythroblasts the expression of this protein was blocked on the mRNA level. Hemin, HO-1 agonist, induces HO-1 and Ft co-expression in U937 cells on the mRNA and protein levels. HO-1/Ft activation by hemin in U937 cells does not affect their “TF+AA” sensitivity and doubles, for example, the cytarabine sensitivity. “TF+AA” appeared to cause up-regulation of HO-1/Ft genes, the expression of which quadruples or increases by half, respectively, compared with basal level. Preincubation of U937 myelomonoblasts with deferoxamine, iron chelator, results in doubling of their “TF+AA” resistance. However, the use of iron-containing TF analogs leads to its doubled cytotoxicity.

щите клеток от токсичности ТФ+АК. Система ТФ+АК является индуктором экспрессии генов *HO-1* и *Ft* в миеломонобластах линии U937. В механизм цитотоксического действия ТФ+АК вовлекается внутриклеточный пул «лабильного» негемового железа, и от его содержания зависит чувствительность лейкозных клеток к препарату.

Ключевые слова: гемоксигеназа-1, ферритин, натриевая соль 4,5-октакарбоксифталоцианина кобальта, 4,5-октакарбоксифталоцианин железа, линии лейкозных клеток человека.

Получено: 1 апреля 2019 г.

Принято в печать: 3 сентября 2019 г.

Для переписки: Татьяна Александровна Сидорова, канд. мед. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; e-mail: tatsid@yahoo.com

Для цитирования: Сидорова Т.А., Рябая О.О., Прокофьева А.А., Хоченков Д.А. Гемоксигеназа-1/ферритин в защите лейкозных клеток от окислительного стресса, индуцированного каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». Клиническая онкогематология. 2019;12(4):416–27.

DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-416-427

Conclusion. In leukemia cell line U937 with constitutively active HO-1/Ft the heme-dependent activation of it does not considerably contribute to protection of cells from “TF+AA” toxicity. The system “TF+AA” is HO-1 and Ft expression inducer in U937 myelomonoblasts. Cytotoxic mechanism of “TF+AA” involves intracellular pool of “labile” non-heme iron, the level of which affects the drug sensibility of leukemia cells.

Keywords: heme oxygenase-1, ferritin, sodium salt of cobalt 4,5-octacarboxyphthalocyanine, iron 4,5-octacarboxyphthalocyanine, human leukemia cell lines.

Received: April 1, 2019

Accepted: September 3, 2019

For correspondence: Tat'yana Aleksandrovna Sidorova, MD, PhD, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; e-mail: tatsid@yahoo.com

For citation: Sidorova TA, Ryabaya OO, Prokof'eva AA, Khochenkov DA. Heme Oxygenase-1/Ferritin in Protection of Leukemia Cells from Oxidative Stress Induced by Catalytic System “Teraphtal + Ascorbic Acid”. Clinical oncohematology. 2019;12(4):416–27 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-416-427

ВВЕДЕНИЕ

Гемоксигеназа 1-го типа (HO-1; HSP32) — микросомный фермент I стадии внутриклеточного катаболизма гема (Fe^{2+} -протопорфирина IX), где HO-1 катализирует специфическое окисление α -метиленовой связи порфиринового кольца гема с последующим его раскрытием [1]. Эта оксидазная активность HO-1 считается ее канонической функцией. Физиологический распад гема в клетке, белки-партнеры HO-1 (цитохром P450-редуктаза, биливердинредуктаза, ферритин) и конечные продукты реакции представлены на рис. 1.

Распад гема в клетке сопровождается образованием продуктов с разными биологическими свойствами: окись углерода (CO), биливердин и гемовое железо (Fe^{2+}) [2]. CO, будучи активатором растворимой гуанилатциклазы, запускает ее сигнальный путь с цитопротективными и антиапоптотическими функциями [3]. Биливердин и его восстановленная форма билирубин являются антиоксидантами [4]. Железо (Fe^{2+}), освобожденное из гема, потенциально может служить цитотоксином. Обладая свойствами окислителя-восстановителя, оно способно вступать в химические реакции (реакция Фентона) с образованием активных форм кислорода [5]. В клетке эволюционно отработаны механизмы защиты от биологически активного Fe^{2+} путем активации белка ферропортина (Fe-АТФазы) для экспорта его из клетки и депонирования в белке ферритине (Ft) [6]. Колокализация белков HO-1 и Ft в клетках [7] обеспечивает тесную функциональную связь между ними, необходимую для быстрого депонирования железа. Ft, многомерный (24 субъединицы) белковый комплекс

L/H-цепей, в клетках эукариот локализован главным образом в цитоплазме. Захватывая атомы Fe^{2+} , Ft благодаря феррооксидазной активности H-цепей нейтрализует их и переводит в химически инертное Fe^{3+} в виде минералов-гидроокислов. Этот пул Fe^{3+} является внутриклеточным депо железа, которое в дальнейшем используется для синтеза простетических групп белков: гема (цитохромы) и [Fe-S]-кластеров (аконитаза, рибонуклеотидредуктаза) [8].

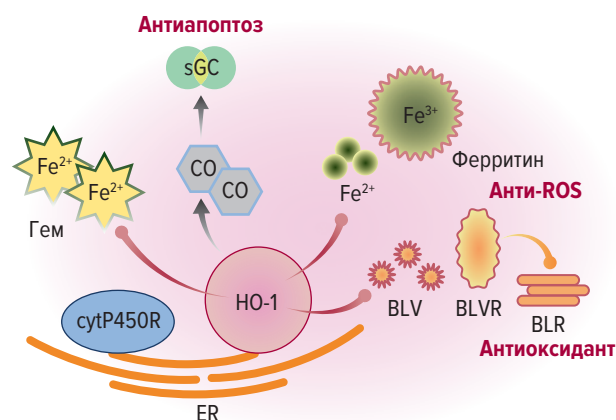


Рис. 1. Каноническая функция HO-1 в клетке BLR — билирубин; BLV — биливердин; BLVR — биливердин-редуктаза; CO — окись углерода; cytP450R — цитохром P450-редуктаза; ER — эндоплазматический ретикулум; ROS — активные формы кислорода; sGC — растворимая гуанилатциклаза.

Fig. 1. Canonical function of HO-1 in a cell BLR — bilirubin; BLV — biliverdin; BLVR — biliverdin reductase; CO — carbon oxide; cytP450R — cytochrome P450 reductase; ER — endoplasmic reticulum; ROS — reactive oxygen species; sGC — soluble guanylate cyclase.

Кроме цитоплазматической HO-1 (32 кДа) с канонической функцией известны и другие изоформы белка со специфическими функциональными свойствами. Ядерные (укороченные) варианты (30 кДа), теряющие активность фермента [9], участвуют в регуляции транскрипции генов [10, 11]. Цитоплазматическая изоформа HO-1 (14 кДа; продукт сплайсинга), обнаруженная в клетках после воздействия ультрафиолетовых (УФ) лучей, связана с пролиферативной активностью клеток и длиной теломер в них [12].

В физиологических условиях для клеток млекопитающих характерен низкий базальный уровень экспрессии HO-1 (мРНК и белка), за исключением ряда органов (селезенка, печень, почки) и клеток (макрофаги), в которых отмечается высокий уровень экспрессии HO-1. В патологических условиях наряду с системными заболеваниями высокий уровень экспрессии HO-1 наблюдается при злокачественных опухолях [13]. Полагают, что HO-1 является важным фактором выживаемости и химиорезистентности опухолевых клеток системы крови: хронического миелолейкоза [14, 15], острых лейкозов [16–18], множественной миеломы [19].

HO-1 — маркер теплового шока (HSP), увеличение экспрессии которого (мРНК/белка) происходит в ответ на воздействие многочисленных стрессорных факторов разной природы, в т. ч. физической: гипертермии [20], УФ-воздействия [21], γ -облучения [22], фотодинамической терапии (ФДТ) [23]; химической: металлов [24], полифенолов-антиоксидантов [25], статинов [26], жирных кислот [27], таксола [28], рапамицина [29]; биологической: фактора некроза опухолей [30], интерлейкина-6 [19]. Ур-регуляция HO-1 (мРНК/белка) может наблюдаться также и в присутствии веществ нестрессорной природы — металлопорфиринов: гема и железосодержащих протопорфиринов

(субстратов HO-1) [2], CoPPIX, MnPPIX (не субстратов) [31] и цинк-протопорфина (ZnPPIX), эндогенного ингибитора HO-1 [32, 33].

Механизмы регуляции экспрессии HO-1 в присутствии индуктора зависят от его природы, которая определяет пути взаимодействия с клеткой и его способность индуцировать в ней окислительный стресс. В настоящее время известно два типа регуляции транскрипции HO-1, в которых участвуют транскрипционные факторы Bach1 и Nrf2. Схема регуляции транскрипции HO-1 представлена на рис. 2.

«Мастером» регуляции транскрипции HO-1, как полагают, является ядерный белок Bach1. Будучи репрессором, он контролирует базальный уровень экспрессии HO-1 [34, 35]. В настоящее время установлено, что в отсутствие индуктора Bach1 в комплексе с малыми белками семейства Maf в виде гетеродимеров (Bach1/Maf) связывается с ARE-сайтами внутри энхансеров (E1 и E2) промотора гена HO-1, блокируя его транскрипцию [36]. Кроме контроля базального уровня экспрессии HO-1 путь Bach1 участвует в механизме его ур-регуляции в присутствии индукторов гемовой природы. Обладая высоким сродством к гему, Bach1 образует с ним комплекс, который в дальнейшем теряет способность связываться с ДНК и образовывать гетеродимеры с белками Maf [37]. В результате происходит дерепрессия энхансеров и активация транскрипции HO-1, а Bach1, связанный с гемом, экспортируется из ядра в цитоплазму и подвергается деградации в протеосомах (см. рис. 2) [38]. С участием Bach1-пути также осуществляется индукция экспрессии HO-1 в присутствии металлопорфиринов (МП) CoPPIX, ZnPPIX и Zn-мезопорфина через усиление деградации комплекса Bach1/МП [33, 39]. Этот процесс в присутствии тяжелых металлов (Cd^{2+}) реализуется через стимуляцию экспорта Bach1 из ядра [40].

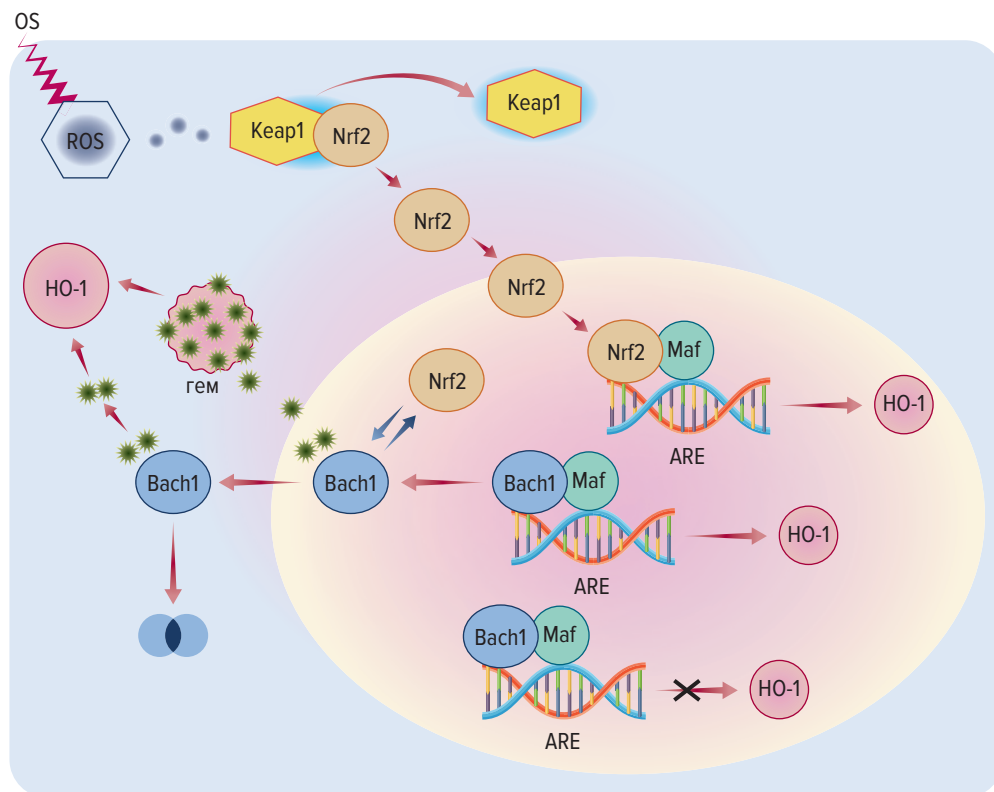


Рис. 2. Гем/Bach1- и ROS/Nrf2-зависимые пути регуляции экспрессии HO-1 в клетках млекопитающих
OS — окислительный стресс; ROS — активные формы кислорода.

Fig. 2. Heme/Bach1- and ROS/Nrf2-dependent pathways of HO-1 expression in mammalian cells
OS — oxidative stress; ROS — reactive oxygen species.

Взаимодействие с клеткой индукторов стрессорной природы, как правило, сопровождается генерацией в ней активных форм кислорода (ROS). ROS, будучи медиаторами в сигнальных процессах при низких концентрациях, при высоких — приводят к нарушению баланса окислителей-восстановителей и развитию в клетке окислительного стресса. Роль ROS в индукции окислительного стресса в клетке установлена для известных индукторов HO-1: УФ-воздействия [41], гипертермии [42], γ -облучения [43], цитотоксинов (H_2O_2) [44], таксола [45]. В ходе эволюции клетка приобретала механизмы защиты от окислительного стресса, включая сигнальный путь с участием транскрипционного фактора Nrf2 (см. рис. 2). В отсутствие стресса транскрипционный фактор Nrf2 находится в цитоплазме клетки в комплексе с белком Keap1. Благодаря этому взаимодействию поддерживается низкий базальный уровень экспрессии генов, регулируемых Nrf2, включая HO-1. При развитии стресса и нарушении гомеостаза окислителей-восстановителей в клетке сульфидрильные связи белка Keap1, чувствительные к окислителям, разрушаются и Nrf2 освобождается из комплекса с Keap1. Свободный Nrf2, минуя деградацию в протеосомах, переносится в ядро, где участвует в регуляции экспрессии генов, которые обеспечивают защиту клеток от стресса и их выживаемость [46, 47]. Nrf2, так же как Bach1, образует в ядре гетеродимеры с белками семейства Maf, которые в дальнейшем связываются с участками ARE внутри энхансеров E1 и E2 на промоторах генов, контролируемых Nrf2, включая HO-1 [48]. Но в отличие от гетеродимеров Bach1/Maf связывание таковых Nrf2/Maf с ДНК приводит к активации транскрипции.

Таким образом, в регуляцию транскрипции HO-1 вовлечены конкурентные отношения между Bach1-репрессором и Nrf2-активатором за связывание с малыми белками семейства Maf и, в дальнейшем, за доступ гетеродимеров к одним и тем же участкам на промоторе гена HO-1. Несмотря на существование равных возможностей, активность Bach1 как репрессора доминирует над активностью Nrf2-активатора и обеспечивает угнетение экспрессии HO-1 [36, 49]. В то же время, как полагают, в клетке происходит динамический обмен между Bach1-репрессорами и Nrf2-активаторами. В этом обмене роль триггера играет свободный гем, выполняя роль сигнальной молекулы в регуляции транскрипции HO-1 [50].

Ур-регуляция HO-1 не всегда сопровождается увеличением экспрессии ее партнера — Ft. Так, для МП (агентов нестрессорной природы) увеличение синтеза Ft (мРНК и белка) наблюдается в условиях индукции экспрессии HO-1 субстратами фермента (гем и железопропорфирины) [51]. Содержание Ft не изменяется при индукции HO-1 в присутствии МП — несубстратов HO-1 (CoPPIX, MnPPIX) [31]. Считается, что ур-регуляция HO-1 с коэкспрессией Ft специфична для индукции гемовым железом [52, 53]. В условиях избытка в клетке гемового железа с целью поддержать его внутриклеточный гомеостаз оно не только депонируется в существующий Ft, но и запускает механизм регуляции синтеза Ft *de novo* на посттранскрипционном уровне. Освобожденное

из гема Fe^{2+} , связываясь в цитоплазме с сенсорным белком IRP, чувствительным к концентрации внутриклеточного железа, инактивирует его, и в дальнейшем комплекс IRP/Fe теряет способность связываться с IRE-сайтом на участке 5' нетранслируемой области (5'-UTR) мРНК Ft, что приводит к дерепрессии синтеза белка [53, 54].

У агентов стрессорной природы, способных индуцировать в клетках окислительный стресс, ур-регуляция HO-1, как правило, сопровождается усилением синтеза Ft (FHC) за счет координированной регуляции белка на уровне транскрипции и трансляции [55]. В условиях окислительного стресса транскрипционный фактор Nrf2 в ядре связывается с E_pRE (электролит-антиоксидант чувствительный элемент)/ARE-участком промотора гена FHC, активируя его транскрипцию [56]. Кроме того, развитие в клетке окислительного стресса приводит к избытку внутриклеточного пула негемового Fe^{3+} и, как в случае гемового, запускается механизм поддержания гомеостаза Fe^{2+} через взаимодействие IRP с сайтом IRE на участке 5'-UTR мРНК Ft, дерепрессия которого приводит к синтезу белка [57, 58].

HO-1/Ft как часть защитной системы клетки выполняет специфическую функцию, направленную на поддержание постоянства внутриклеточного железа.

Ключевая роль в защите клетки от «лабильного» железа как гемовой, так и негемовой природы, как полагают, принадлежит Ft. В пользу этого утверждения свидетельствуют данные о том, что как добавление Ft к клеткам (в виде апоферритина), так и индукция эндогенного Ft неорганическим железом ($FeSO_4$, Fe_3 -цитратом) способствуют защите клеток от окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 [59], геминном [60, 61] и ФДТ [23, 62]. Цитопротективный эффект системы HO-1/Ft обеспечивается не только колокализацией HO-1 и Ft в клетке [7], но и коэкспрессией Ft, преимущественно белка Н-цепи — FHC. Последний благодаря ферроксидазной активности контролирует прооксидантный эффект «лабильного» железа, освобожденного из гема. Также в условиях избытка негемового железа основной вклад в поддержание его гомеостаза в клетке вносит FHC. Таким образом, в условиях избытка железа именно FHC обеспечивает метаболическую адаптацию клеток и тканей [63].

В онкологии, включая онкогематологию, опухолевые заболевания нередко сопровождаются различными осложнениями: кровоизлияниями, сопутствующими инфекциями, воспалительными и иммуноопосредованными процессами. При перечисленных состояниях возможна перегрузка клеток и тканей организма железом, включая его формы с прооксидантными свойствами. Кроме того, противоопухолевое лечение больных (химиотерапия, облучение, ФДТ) сопровождается индукцией в клетках окислительного стресса, в ходе которого появляется пул «лабильного» железа внутри клеток, а при их гибели — в окружающей среде. Для защиты от избытка железа с прооксидантными свойствами в клетках индуцируется система HO-1/Ft.

Известно, что механизм цитотоксического действия противоопухолевого средства в виде каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кис-

лота» (ТФ+АК) сопровождается генерацией в клетке ROS и последующим развитием окислительного стресса [64]. Ранее нами было установлено, что внутриклеточный фермент каталаза играет роль в защите от окислительного стресса, индуцированного системой ТФ+АК в лейкозных клетках [65].

Цель настоящей работы — исследовать значение системы HO-1/Ft в защите лейкозных клеток от токсического воздействия противоопухолевого средства ТФ+АК. Нам предстояло выяснить, влияет ли активация гемом системы HO-1/Ft на токсичность ТФ+АК, является ли сам препарат ТФ+АК модулятором активности системы HO-1/Ft (на уровне мРНК и белка), а также оценить роль «лабильного» железа в механизме цитотоксичности ТФ+АК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 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, H_2O_2 , FePPIX, ZnPPIX, 2,7-диацетат-дихлорфлюоресцеин (DCFH-DA), дефероксамин мезилат (ДФО), Hepes, PBS, полученные от компании Sigma (США); Трис-НСl, Трис-ОН, NaCl, ДМСО, NaOH (Roth, Германия); метанол (Merck, Германия). Химиопрепараты: терафтал-лио — препарат совместного производства ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»» и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ; 4,5-октакарбокситалозианин железа (OсPсFe) синтезирован ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»»; цитарабин от компании Pfizer (США). Поликлональные антитела к HO-1 получены из Merck Bioscience (Германия); поликлональные антитела к Ft (F5012, к обеим субъединицам белка) — из Sigma, моноклональные антитела к актину — из Amersham (Великобритания). Иммуноглобулины антикроличий IgG (для HO-1, Ft) и антимышинный IgG (клон С4, для актина) получены из Amersham и Chemicon (США) соответственно. ELC-система приготовлена согласно стандартному протоколу.

Культуры клеток

В исследовании использовали культуры клеток миеломонобластного лейкоза человека линии U937, эритробластного лейкоза человека линии K562. Для поддержания линий и проведения исследований лейкозные клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10% FCS, 2 мМ глутамина и антибиотики (стрептомицин + пенициллин).

Исследование жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro*

Для изучения цитотоксической активности препаратов использовали МТТ-метод, подробно описанный в нашей работе [65]. Величина IC_{50} — критерия цитотоксичности исследованных препаратов — была вычислена с помощью метода численных решений по трем экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля первой производной экспериментальной кривой выживаемости клеток и представлена в виде $(M \pm m)$. Для оценки эффективности модулятора

(М) в комбинации с препаратами использовался индекс резистентности (IR), равный отношению:

$$IR = IC_{50} (\text{препарат} + M) / IC_{50} \text{ препарата.}$$

Величина $IR > 1,0$ в присутствии нетоксических концентраций модулятора (выживаемость не менее 80 % клеток по сравнению с контрольными клетками) свидетельствовала о снижении чувствительности клеток к препарату, а $IR < 1,0$ — об увеличении их чувствительности.

В исследовании каталитическая система ТФ+АК, имеющая исходно соотношение ТФ и АК 1:10, представлена по концентрации ТФ.

Исследование белков методом вестерн-блоттинга

Для исследования влияния препаратов на синтез белков HO-1/Ft клетки рассаживали на 6-луночные планшеты (1×10^6 клеток/3 мл среды/луноку) и инкубировали в течение 12–14 ч в присутствии препаратов и без них. Для выделения белков клетки из 2 лунок лизировали в 100 мкл Трис-ЭДТА буфера (рН 7,5), содержащего 20 мМ Трис-ОН, 0,5 мМ ЭДТА, 10 мкл/1 мл коктейля ингибиторов (1:100), 10 мкл/1 мл PMSF при температуре 4 °С в течение 40 мин. Концентрацию белков определяли методом Бредфорда [66], в качестве стандарта использовался BSA.

Электрофорез белков в SDS-полиакриламидном геле и иммуноблоттинг

Пробы, содержащие 40 мкг белка (HO-1, Ft), 20 мкг белка (актин) и 5-кратный буфер для нанесения белков на гель (конечная концентрация 1-кратная), ДТТ 1 мМ, прогревали в термостате при температуре 95 °С в течение 5 мин. Разделение белков проводили по методу Laemmli [67] в 10% SDS-полиакриламидном геле в течение 2 ч при напряжении поля 80 мВ для центрирующего геля и 100–150 мВ для разделяющего геля. Белки из геля переносили на PVD-мембрану (Amersham) в течение ночи при 4 °С при параметрах тока 300 мА. Буфер для переноса содержал 20 % метанола. Мембрану после переноса белков красили раствором Rounco 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 температуре 4 °С на шейкере, трижды отмывали в 15 мл 1xTBS-T в течение 10 мин. Со вторыми антителами, меченными пероксидазой, мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с последующей 3-кратной промывкой в 15 мл 1xTBS-T. Все антитела разводили в 5% обезжиренном молоке в 1xTBS-T в конечной концентрации 1:1000 (HO-1/Ft, актин) и 1:10 000 (иммуноглобулины).

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

Исследование экспрессии генов HO-1 и Ft (FHC) в опухолевых клетках методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Выделение РНК из клеток и синтез кДНК. Через 6 ч после культивирования с препаратами

клетки лизировали реагентом TRIzol из расчета 1 мл на 1×10^6 клеток согласно стандартной методике. Концентрацию РНК определяли с помощью Quant-IT RNA Assay Kit согласно протоколу производителя (Invitrogen, США). Для синтеза кДНК брали 250 нг РНК и проводили обратную транскрипцию в конечном объеме смеси 20 мкл с использованием iScript™ Select cDNA Synthesis Kit согласно инструкции (Bio Rad, США). Реакцию проводили при температуре 42 °С в течение 70 мин. Фермент-обратную транскриптазу (ревертазу) инактивировали нагреванием реакционной смеси до 85 °С в течение 5 мин. Контроль обратной транскрипции проводили при отсутствии обратной транскриптазы.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Количественная ПЦР в реальном времени проводилась на Light Cycler 96 (Roche, США) и CFX96 Real-Time System (Bio Rad, США) с использованием коммерческой смеси iTaq® Universal SYBR® Green Supermix согласно протоколу производителя (Bio Rad, США). В качестве матрицы для ПЦР была использована кДНК образцов. Уровень экспрессии мРНК *HO-1* и *FHC* определяли путем нормализации образцов к референсным генам (β -actin и *GAPDH*). ПЦР-реакционная смесь содержала 2 мкл (50 нг) кДНК и 5 пкмоль праймеров, последовательности которых представлены в табл. 1.

Условия амплификации: предварительная обработка 5 мин при температуре 95 °С, последующие 39 циклов: 95 °С — 5 с; 60 °С — 30 с; 72 °С — 30 с. Анализ кривых плавления проводили путем определения флуоресценции при постепенном нагревании образцов до 95 °С с шагом 0,5 °С/с. Все образцы анализировались в триплетах в 96-луночных низкопрофильных планшетах. Результаты количественной ПЦР с обратной транскрипцией представлены второй производной от среднего значения порогового цикла в триплете для каждого образца ($\Delta\Delta Ct$).

Исследование внутриклеточного уровня ROS

Базальный и индуцированный препаратами уровни ROS в клетках определяли с помощью красителя DCFH-DA согласно методике, описанной ранее [65]. В день эксперимента клетки рассеивали на 12-луночные планшеты в концентрации 1×10^6 клеток/2 мл среды. В соответствующие лунки добавляли препараты: ТФ+АК (62,5 мкМ), H_2O_2 (200 мкМ) и инкубировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 4 и 2 ч соответственно. Для оценки спо-

собности дефероксамина (ДФО) связывать свободное Fe^{2+} и ROS к клеткам за 1 ч до внесения препаратов добавляли ДФО (50 мкМ). За 30 мин до окончания времени инкубации клеток с препаратами добавляли 20 мкл DCFH-DA (10 мкМ) и продолжали инкубацию в тех же условиях. После инкубации суспензию клеток из планшета переносили в эппендорфы, центрифугировали в течение 5 мин при температуре 10 °С со скоростью 1800 об./мин, 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 $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Лейкозные миеломонобласты линии U937 — адекватная экспериментальная модель *in vitro* для исследования роли *HO-1*/Ft в механизме действия каталитической системы ТФ+АК

Для поиска адекватной экспериментальной модели *in vitro* с исходно активной системой *HO-1*/Ft, чувствительной к регуляции гемом, эндогенным субстратом *HO-1* (в нашем исследовании — гемом, FePPIX), мы исследовали базальный и FePPIX-индуцированный уровни экспрессии *HO-1* и Ft (мРНК и белка) в лейкозных клетках человека двух линий: U937 (миеломонобласты) и K562 (эритробласты).

По нашим данным, представленным на рис. 3, в лейкозных клетках U937 величина исходной экспрессии *HO-1* регистрируется на низком уровне, но в присутствии FePPIX наблюдается up-регуляция экспрессии этого гена (в 2 раза) (рис. 3, А). По сравнению с *HO-1* базальный уровень экспрессии *FHC* гораздо выше (в 10 раз). Величина его возрастает в 1,5 раза в присутствии FePPIX (рис. 3, Б).

В аналогичных условиях базальный уровень экспрессии *HO-1* в клетках линии K562 не выявляется

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для анализа уровня экспрессии генов, и размер продукта

Ген	Последовательность прямого(F)/обратного(R) праймера	Размер продукта, п. н.
<i>HO-1</i>	F: 5'-CGGGCCAGCAACAAAGTG-3' R: 5'-AGTGTAAAGACCCATCGGAGAA-3'	107
<i>hFHC</i>	F: 5'-GTAACGCCAGTTCACCATCAGGAGTACT-3' R: 5'-TTTCCAAATGTAATGCACACTCCATT-3'	276
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GGGGAGCCAAAGGGTTCATCATCT-3' R: 5'-GACGCCTGCTTACCACCTTCTTG-3'	212
<i>β-actin</i>	F: 5'-GTGGGGCGCCCAAGGACCA-3' R: 5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTC-3'	201

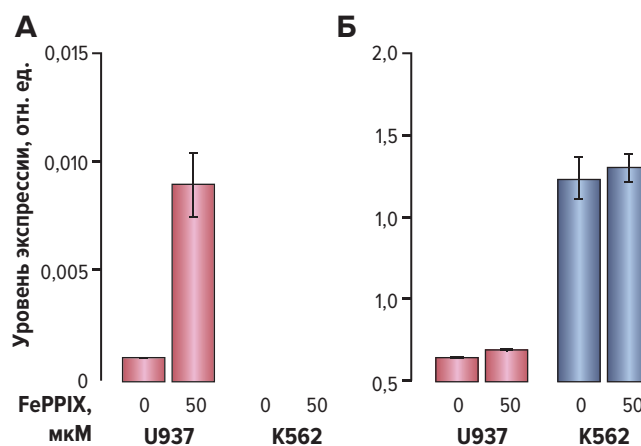


Рис. 3. Базальный и индуцированный гемом уровни экспрессии генов (А) *HO-1* и (Б) *FHC* в лейкозных клетках линий U937 (миеломонобласты) и K562 (эритробласты)

Fig. 3. Basal and hemin-induced levels of (A) *HO-1* and (B) *FHC* expression in leukemia cell lines U937 (myelomonoblasts) and K562 (erythroblasts)

и не индуцируется в присутствии гемина (см. рис. 3, А). В этих же клетках исходно регистрируется высокий базальный уровень экспрессии *FHC*, величина которого не изменяется в присутствии гемина (см. рис. 3, Б). По данным литературы, для клеток линии K562 характерен исходно высокий уровень экспрессии NO-1 (мРНК и белка), которая является BCR/ABL-зависимым фактором выживаемости этих клеток [14]. В то же время встречаются данные о существовании сублиний K562, в клетках которых не регистрируется базальный уровень экспрессии NO-1 (мРНК и белка) и не наблюдается индукции в присутствии гемина [68]. В клетках таких сублиний, как полагают, отсутствие NO-1 в клетках линии K562 компенсируется экспрессией в них изоформы NO-2, использующей, как и NO-1, в качестве субстрата гемин и ассоциированной с down-регуляцией NO-1 [69], а также экспрессией белка, участвующего в экспорте гема из клетки для снижения его цитотоксичности. По нашим данным, в отличие от U937 в лейкозных клетках K562, используемых в настоящем исследовании, обнаружен высокий уровень экспрессии *Bach1*, репрессора транскрипции NO-1 (данные полуколичественной ОТ-ПЦР не представлены), что не исключает механизм *Bach1*-зависимой транскрипционной репрессии синтеза мРНК NO-1 [70]. Несмотря на то что мы не располагаем данными о существовании в клетках K562 изоформы NO-2, отсутствие up-регуляции *FHC* в этих клетках геминем FePPIX косвенно свидетельствует о том, что NO-2 не участвует в механизме регуляции экспрессии NO-1 (см. рис. 3, Б).

Исследование экспрессии белков NO-1 и Ft в лейкозных клетках показало, что NO-1 в клетках линии U937 выявляется на базальном низком уровне и его экспрессия увеличивается после инкубации клеток в присутствии гемина. При этом отмечается дозозависимый характер влияния FePPIX на уровень экспрессии белка NO-1 (рис. 4). В этих же условиях базальный уровень экспрессии белка Ft также увеличивается при инкубации клеток в присутствии гемина. Таким образом, в клетках U937 наблюдается специфическая для гемина коэкспрессия NO-1 и Ft (на уровне мРНК и белка), что также свидетельствует о наличии в клетках функционально-активного белка NO-1. Полученные данные о наличии в клетках U937 конститутивно-активной системы NO-1/Ft и ее регуляции геминем позволили нам использовать эти клетки в качестве модели для исследования роли NO-1/Ft в механизме защиты от токсического воздействия ТФ+АК.

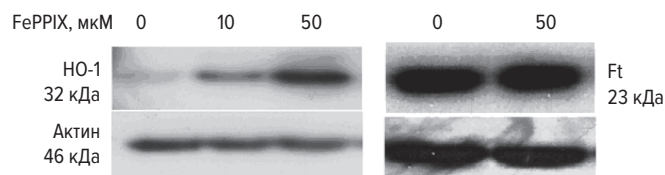


Рис. 4. Экспрессия белков (А) NO-1 и (Б) Ft в лейкозных клетках U937 в присутствии гемина FePPIX и без него

Fig. 4. (A) NO-1 and (B) Ft proteins expression in leukemia U937 cells with and without FePPIX hemin

Исследование влияния гемин-индуцированного уровня экспрессии NO-1 в клетках U937 на их чувствительность к системе ТФ+АК

По данным литературы, базальный уровень экспрессии NO-1 (мРНК/белка) влияет на чувствительность опухолевых клеток к агентам стрессорной природы. Снижение уровня базальной экспрессии NO-1 путем нокаута NO-1 с использованием малых интерферирующих РНК (миРНК) приводит к увеличению токсичности препаратов [14, 71, 72]. По нашим данным, чувствительность к генераторам ROS ТФ+АК и H_2O_2 клеток двух линий миелоидной природы U937 и K562 с разной базальной активностью NO-1 оказалась различной. Клетки U937 с конститутивно-активной NO-1 были в 2 раза устойчивее по сравнению с клетками K562, в которых экспрессия NO-1 не регистрировалась на уровне мРНК (рис. 5). Величины IC_{50} ТФ+АК/ H_2O_2 для клеток U937 составляют 55 ± 2 и 100 ± 15 мкМ, а для K562 — 27 ± 4 и $53,4 \pm 10,0$ мкМ соответственно. Поскольку, по нашим данным, клетки обеих линий обладают высоким базальным уровнем экспрессии каталазы [65], этот фермент, по-видимому, вносит одинаковый вклад в защиту этих клеток от токсичности генераторов ROS ТФ+АК и H_2O_2 .

В дальнейших исследованиях процедура нокаута NO-1 с помощью миРНК для подавления базальной экспрессии гена в клетках U937 позволит выявить роль базальной экспрессии NO-1 в чувствительности лейкозных клеток U937 к ТФ+АК/ H_2O_2 .

Чтобы оценить влияние экспрессии NO-1, индуцированной геминем, на чувствительность лейкозных клеток U937 к ТФ+АК/ H_2O_2 , мы исследовали их выживаемость. По нашим данным, представленным на рис. 6, в условиях активации NO-1/Ft (FePPIX 50 мкМ в течение 12 ч) величина IC_{50} ТФ+АК не изменилась, а H_2O_2 — увеличилась в 1,5 раза и составила 150 ± 25 мкМ. Несмотря на отсутствие признаков защиты, в общей популяции обнаруживается фракция клеток, способных выживать при высоких концентрациях препаратов ТФ+АК и H_2O_2 (см. рис. 6).

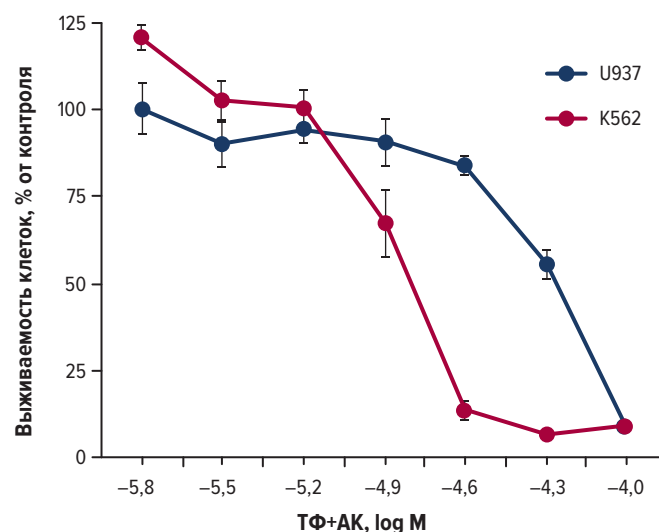


Рис. 5. Чувствительность лейкозных клеток U937 и K562 к системе ТФ+АК

Fig. 5. "TF+AA" sensitivity of leukemia U937 and K562 cells

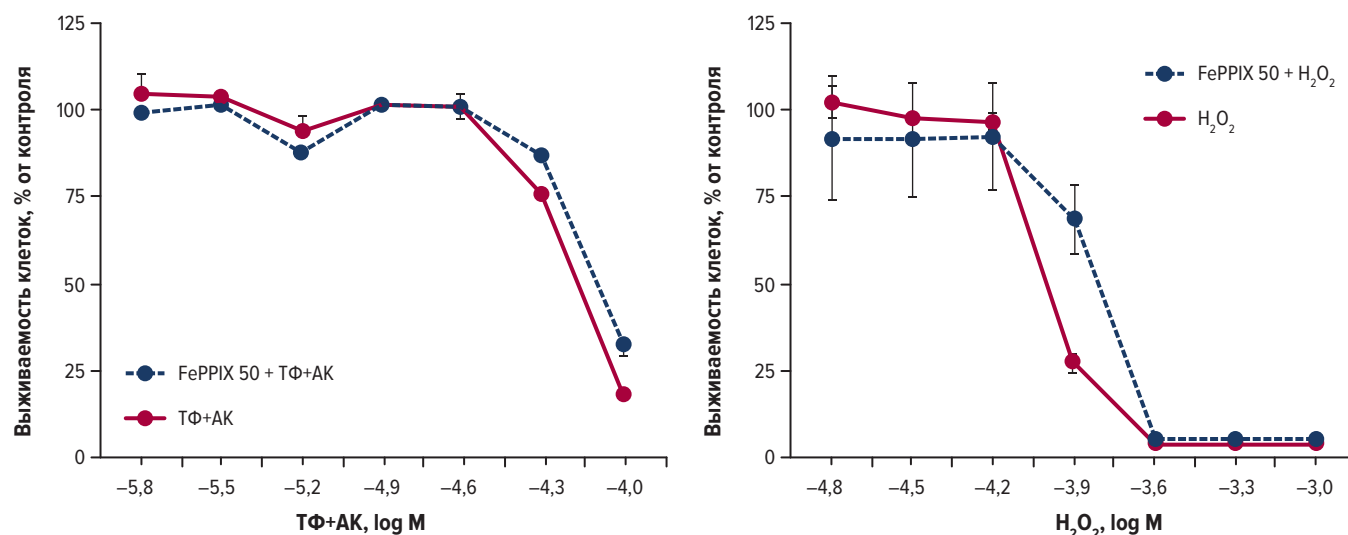


Рис. 6. Чувствительность лейкозных клеток U937 к (А) ТФ+АК и (Б) H₂O₂ после индукции в них экспрессии HO-1 гемом

Fig. 6. (A) "TF+AA" and (B) H₂O₂ sensitivity of leukemia U937 cells with induction of HO-1 expression by hemin

Можно предположить, что в исходной гетерогенной популяции лейкозных клеток U937 присутствует субпопуляция клеток, в которой гемин-индуцированная активация системы HO-1/Ft обеспечивает их устойчивость к ТФ+АК/H₂O₂.

В условиях индукции экспрессии HO-1 гемом, по нашим данным, увеличивается чувствительность лейкозных клеток U937 к цитарабину (AraC) в 2 раза: IC₅₀ = [(2,2 ± 0,03) × 10⁻⁸ М и (1,1 ± 0,02) × 10⁻⁸ М соответственно] (рис. 7). Другие исследователи также отмечали в присутствии гемина сенситизацию клеток линии U937 к AraC и в той же степени (в 2 раза) [73]. Повышение чувствительности лейкозных клеток миелоидного ряда к AraC в присутствии гемина, как установлено, тесно коррелирует с индукцией в них эритроидной дифференцировки [73, 74]. Поскольку гемин не обладает способностью индуцировать синтез гемоглобина в лейкозных клетках U937 [73], его вмешательство в механизм действия AraC может происходить независимо от индукции дифференцировки и вовлекать HO-1, например, через процесс аутофагии, регулируемый HO-1 [75], а также по независимому от HO-1 пути.

Чтобы выяснить, зависит ли чувствительность опухолевых клеток к ТФ+АК от активности HO-1, мы использовали ZnPPXI в качестве ингибитора активности HO-1. По нашим данным, клетки U937 оказались высокочувствительными к ZnPPXI (IC₅₀ = 2,0 ± 0,03 мкМ). Чувствительность клеток U937 к ТФ+АК как в условиях базальной, так и гемин-индуцированной активности системы HO-1/Ft после предынкубации их с ингибитором HO-1 (в нетоксической концентрации 1 мкМ) не изменилась. В то же время в аналогичных условиях в клетках U937 мы наблюдали увеличение экспрессии HO-1 на уровне мРНК и белка (данные не представлены), что согласуется с результатами других исследователей [32, 33, 76].

Каталитическая система ТФ+АК — индуктор коэкспрессии HO-1/FCH в клетках U937

Поскольку ТФ+АК обладает способностью генерировать ROS [64] с последующим развитием

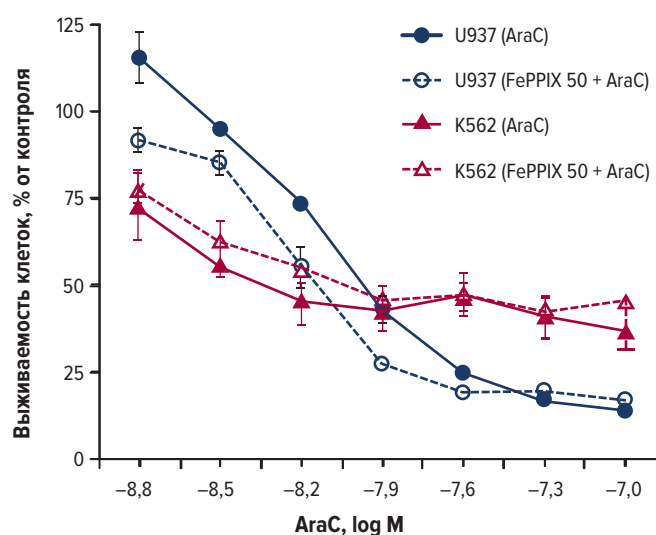


Рис. 7. Чувствительность лейкозных клеток U937 и K562 к AraC после индукции в них экспрессии HO-1 гемом

Fig. 7. AraC sensitivity of leukemia U937 and K562 cells with induction of HO-1 expression by hemin

в клетке окислительного стресса [65], мы предположили, что сам препарат является индуктором системы HO-1/Ft в клетках U937. По нашим данным, представленным на рис. 8, при инкубации клеток U937 с ТФ+АК увеличивается экспрессия генов HO-1 (рис. 8, А, 2) и FCH (рис. 8, Б, 2) в 4 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контрольными образцами. В этих же условиях H₂O₂ также вызывает усиление экспрессии мРНК обоих генов (рис. 8, А–Б, 3). Таким образом, воздействие на опухолевые клетки ТФ+АК сопровождается у-регуляцией экспрессии генов белков-участников системы HO-1/Ft, в механизм которой вовлечен ROS-зависимый путь. Кроме того, нельзя исключить, что в индукции экспрессии HO-1 может участвовать и ТФ, компонент каталитической системы ТФ+АК, молекула которого имеет сходное с МП строение. Выяснение роли ТФ в индукции экспрессии HO-1 и его способности

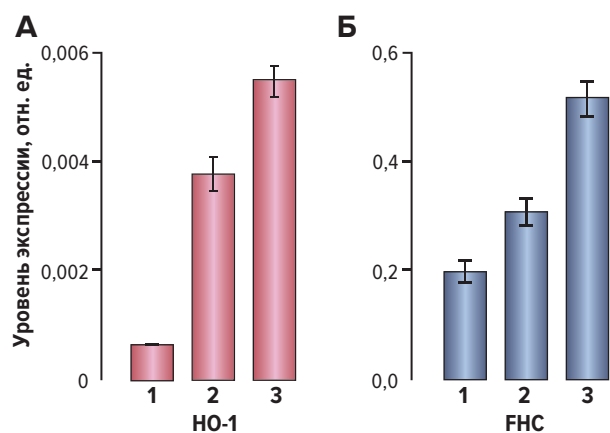


Рис. 8. Базальный и препарат-индуцированный уровни экспрессии генов (А) *HO-1* и (Б) *FHC* в лейкозных клетках U937:

1 — контрольные клетки без препаратов; 2 — ТФ+АК 50 мкМ, инкубация 6 ч; 3 — H_2O_2 100 мкМ, инкубация 6 ч

Fig. 8. Basal and drug-induced levels of (A) *HO-1* and (Б) *FHC* expression in leukemia U937 cells:

1 — drug-free control cells; 2 — “TF+AA” 50 μM, 6-hour incubation; 3 — H_2O_2 100 μM, 6-hour incubation

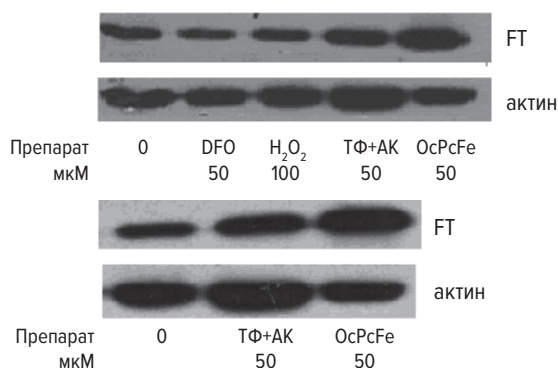


Рис. 9. Базальная и препарат-индуцированная экспрессия белка *FHC* в лейкозных клетках U937 (данные 2 экспериментов)

Fig. 9. Basal and drug-induced expression of *FHC* protein in leukemia U937 cells (data of two experiments)

модулировать индукцию *HO-1* геминном — задача дальнейших наших исследований.

Увеличивается ли в условиях инкубации лейкозных клеток с ТФ+АК и H_2O_2 содержание белков *HO-1* и Ft в них? По нашим данным, после воздействия ТФ+АК и H_2O_2 (в нетоксических для клеток U937 концентрациях) базальный низкий уровень экспрессии белка *HO-1* не изменялся (данные не представлены). В то же время содержание белка Ft снижалось (см. рис. 7), что навело нас на мысль о возможном вовлечении внутриклеточного Fe^{2+} в механизм действия этих агентов. Чтобы выяснить, действительно ли внутриклеточный пул Fe^{2+} с прооксидантными свойствами влияет на цитотоксичность ТФ+АК/ H_2O_2 , мы использовали DFO, известный хелатор Fe^{2+} .

Известно, что DFO, проникая в клетку, связывает цитозольное Fe^{2+} и снижает его внутриклеточный пул. В условиях дефицита Fe^{2+} в лейкозной клетке, вызванного хелатором, для сохранения внутриклеточного баланса запускается процесс деградации Ft для реутилизации Fe^{2+} . DFO как нерастворимый агент и имеющий специфический путь проникновения в клетку является индуктором аутофагии Ft в лизо-

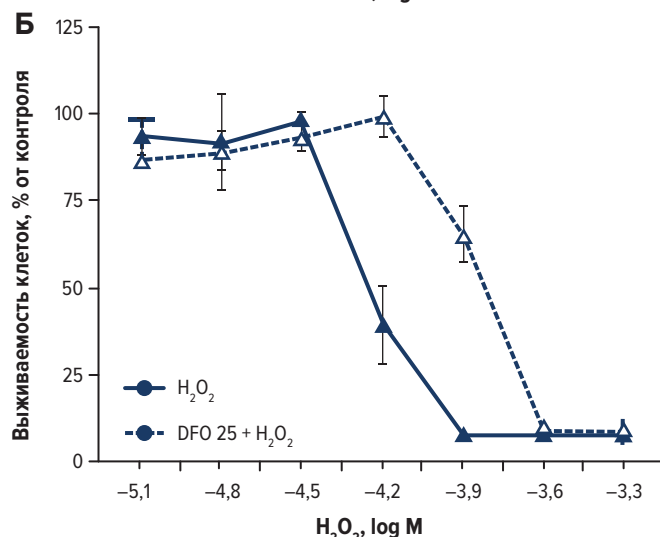
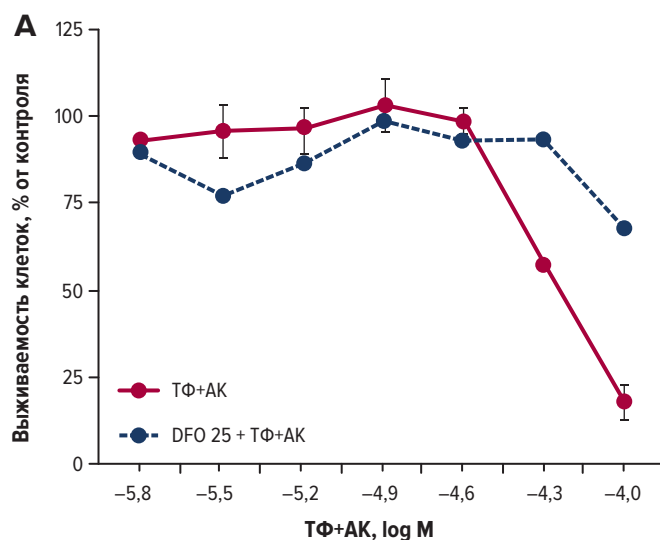


Рис. 10. Чувствительность лейкозных клеток U937 к (А) ТФ+АК и (Б) H_2O_2 после предынкубации их с DFO

Fig. 10. (A) “TF+AA” and (Б) H_2O_2 sensitivity of leukemia U937 cells after preincubation with DFO

сомах [77]. По нашим данным, при инкубации клеток U937 с DFO наблюдается снижение базального уровня содержания Ft в них (рис. 9), что свидетельствует о включении лизосомного пути деградации ферритина.

После предынкубации клеток с DFO в нетоксической концентрации (25 мкМ) цитотоксичность ТФ+АК/ H_2O_2 снижалась в 2 раза (рис. 10). Эти данные подтверждают гипотезу о вовлечении Fe^{2+} в механизм цитотоксичности ТФ+АК.

Свидетельством вовлечения Fe^{2+} в реализацию цитотоксического эффекта системы ТФ+АК и H_2O_2 являются также данные о способности DFO снижать ROS/DCFH-DA-опосредованную флуоресценцию клеток U937 (рис. 11).

Железосодержащий комплекс фталоцианина (OcPcFe) увеличивает токсичность ТФ+АК для лейкозных клеток U937

По данным литературы, увеличение экспрессии эндогенного Ft неорганическим железом ($FeSO_4$, Fe^{3+} -цитрат) способствует защите клеток от окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 [59]. Можно ли с

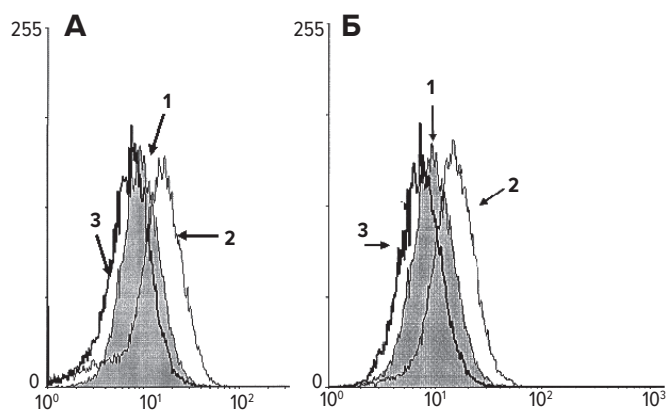


Рис. 11. Образование ROS в лейкозных клетках U937, индуцированных (А) ТФ+АК и (Б) H_2O_2 в присутствии DFO и без него

А: 1 — контрольные клетки без препаратов; 2 — ТФ+АК 62,5 мкМ, инкубация 4 ч; 3 — DFO 50 мкМ, инкубация 1 ч + ТФ+АК 62,5 мкМ, инкубация 4 ч; Б: 1 — контрольные клетки без препаратов; 2 — H_2O_2 400 мкМ, инкубация 2 ч; 3 — DFO 50 мкМ, инкубация 1 ч + H_2O_2 400 мкМ, инкубация 2 ч

Fig. 11. Production of ROS in leukemia U937 cells which are induced by (А) “TF+AA” and (Б) H_2O_2 with and without DFO

А: 1 — drug-free control cells; 2 — “TF+AA” 62,5 μ M, 4-hour incubation; 3 — DFO 50 μ M, 1-hour incubation + “TF+AA” 62,5 μ M, 4-hour incubation; Б: 1 — drug-free control cells; 2 — H_2O_2 400 μ M, 2-hour incubation; 3 — DFO 50 μ M, 1-hour incubation + H_2O_2 400 μ M, 2-hour incubation

помощью железосодержащих препаратов, увеличивая пул негемового железа в клетке, модулировать токсичность системы ТФ+АК для клеток U937?

В качестве модулятора внутриклеточного железа мы использовали вещество с неорганическим железом — железосодержащий комплекс фталоцианина (OсPсFe), в присутствии которого, по нашим данным, увеличивается уровень Ft в клетке (см. рис. 8). Неожиданно комбинация ТФ+АК с OсPсFe (в нетоксической концентрации модулятора 50–100 мкМ) оказалась в 2–4 раза токсичнее, чем без него (рис. 12). В аналогичных условиях чувствительность лейкозных клеток к H_2O_2 в присутствии OсPсFe не изменилась (см. рис. 12).

Включение DFO в комбинацию ТФ+АК + OсPсFe привело к нивелированию эффекта сенситизации OсPсFe клеток к системе ТФ+АК (данные не представлены).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, используя в качестве экспериментальной модели лейкозные клетки линии U937 с конститутивно-активной системой NO-1/Ft, регулируемой гемом, мы показали, что NO-1/Ft, с одной стороны, не играет существенной роли в защите лейкозных клеток от токсического воздействия ТФ+АК, с другой — вносит вклад в сенситизацию клеток к АгаС. В миеломонобластах линии U937 каталитическая система ТФ+АК является индуктором коэкспрессии генов *NO-1/Ft*, увеличивая их экспрессию в 4 и 1,5 раза соответственно по сравнению с базальным уровнем. В присутствии ТФ+АК уровень экспрессии белка NO-1 не изменяется, а Ft — уменьшается. Связывание внутриклеточного железа снижает токсичность

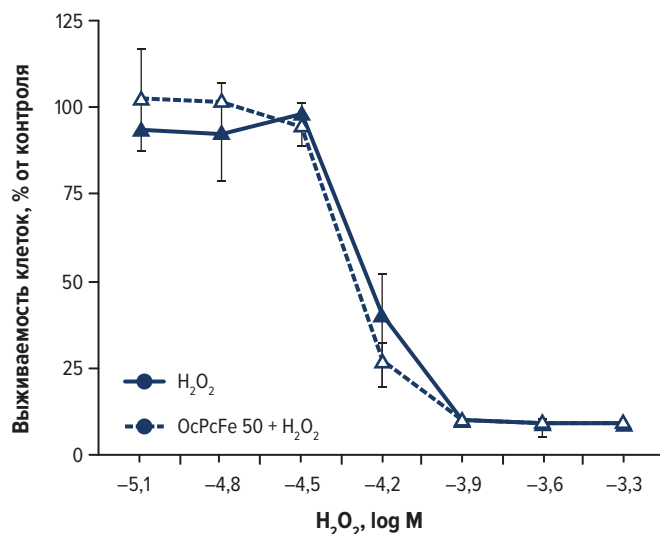
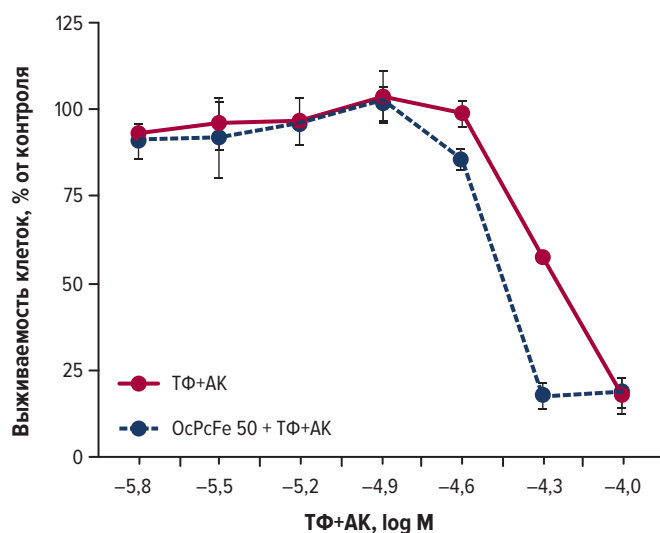


Рис. 12. Чувствительность лейкозных клеток U937 к (А) ТФ+АК и (Б) H_2O_2 в присутствии железосодержащего комплекса фталоцианина (OсPсFe) и без него

Fig. 12. (А) “TF+AA” and (Б) H_2O_2 sensitivity of leukemia U937 cells with and without iron-containing phthalocyanine complex (OсPсFe)

системы ТФ+АК, что свидетельствует о вовлечении Fe^{2+} с прооксидантными свойствами в механизм действия препарата. Включение в схему железосодержащего комплекса фталоцианина (OсPсFe) в качестве модулятора внутриклеточного железа приводит к сенситизации клеток к системе ТФ+АК.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ROS-зависимая активация системы NO-1/Ft препаратами может влиять на эффективность химиотерапии у больных с лейкозами.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Москвы.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Т.А. Сидорова.

Сбор и обработка данных: все авторы.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: Т.А. Сидорова.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Yoshida T, Kikuchi G. Sequence of the reaction of heme catabolism catalyzed by the microsomal heme oxygenase system. *FEBS Lett.* 1974;48(2):256–61. doi: 10.1016/0014-5793(74)80481-3.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;61(2):748–55.
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. In: Vallyathan V, Shi X, Castranova V, eds. *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease.* Springer; 2002. pp. 249–63. doi: 10.1007/978-1-4615-1087-1_29.
- Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(24):9748–52. doi: 10.1073/pnas.85.24.9748.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Gozzelino R, Arosio P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):E130. doi: 10.3390/ijms17010130.
- Cheng HT, Yen CJ, Chang CC, et al. Ferritin heavy chain mediates the protective effect of heme oxygenase-1 against oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(12):2506–17. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.09.018.
- Balla G, Jacob HS, Balla J, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 1992;267(25):18148–53.
- Lin Q, Weis S, Yang G, et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20621–3. doi: 10.1074/jbc.M607954200.
- Biswas C, Shah N, Muthu M, et al. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem.* 2014;289(39):26882–94. doi: 10.1074/jbc.M114.567685.
- Vanella L, Barbagallo I, Tibullo D, et al. The non-canonical functions of the heme oxygenases. *Oncotarget.* 2016;7(42):69075–86. doi: 10.18632/oncotarget.11923.
- Bian C, Zhong M, Nisar MF, et al. A novel heme oxygenase-1 splice variant, 14kDa HO-1, promotes cell proliferation and increases relative telomere length. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(2):429–34. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.096.
- Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(1):1–25. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.010.
- Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2004;64(9):3148–54. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-1200.
- Schaefer B, Behrends S. Translocation of heme oxygenase-1 contributes to imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(40):67406–21. doi: 10.18632/oncotarget.18684.
- Li Volti G, Tibullo D, Vanella L, et al. The Heme Oxygenase System in Hematological Malignancies. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(6):363–77. doi: 10.1089/ars.2016.6735.
- Zhe N, Wang J, Chen S, et al. Heme oxygenase-1 plays a crucial role in chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Hematology.* 2015;20(7):384–91. doi: 10.1179/1607845414Y.0000000212.
- Herrmann H, Kneidinger M, Cerny-Reiterer S, et al. The Hsp32 inhibitors SMA-ZnPP and PEG-ZnPP exert major growth-inhibitory effects on D34+/CD38+ and CD34+/CD38- AML progenitor cells. *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;12(1):51–63. doi: 10.2174/156800912798888992.
- Wu W, Ma D, Wang P, et al. Potential crosstalk of the interleukin-6-heme oxygenase-1-dependent mechanism involved in resistance to lenalidomide in multiple myeloma cells. *FEBS J.* 2016;283(5):834–49. doi: 10.1111/febs.13633.
- Raju VS, Maines MD. Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1217(3):273–80. doi: 10.1016/0167-4781(94)90286-0.
- Vile GF, Tyrrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem.* 1993;268(20):14678–81.
- McDonald JT, Kim K, Norris AJ, et al. Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer Res.* 2010;70(21):8886–95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0171.
- Lin F, Girotti AW. Hyperresistance of leukemia cells to photodynamic inactivation after long-term exposure to hemin. *Cancer Res.* 1996;56(20):4636–43.
- Mitani K, Fujita H, Fukuda Y, et al. The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells. *Biochem J.* 1993;290(Pt 3):819–25. doi: 10.1042/bj2900819.
- Ogborne RM, Rushworth SA, Charalambos CA, et al. Haem oxygenase-1: a target for dietary antioxidants. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt 6):1003–5. doi: 10.1042/bst0321003.
- Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, et al. The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(12):2064–71. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.009.
- Cui ZG, Ogawa R, Tsuneyama K, et al. Insight into the molecular mechanism of heme oxygenase-1 induction by dicosahexaenoic acid in U937 cells. *Chem Biol Interact.* 2015;238:180–8. doi: 10.1016/j.cb.2015.07.005.
- Choi BM, Kim YM, Jeong YR, et al. Induction of heme oxygenase-1 is involved in anti-proliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(1):132–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.120.
- Visner GA, Lu F, Zhou H, et al. Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells: implications in the antiproliferative response to rapamycin. *Circulation.* 2003;107(6):911–6. doi: 10.1161/01.cir.0000048191.75585.60.
- Rushworth SA, MacEwan DJ. HO-1 underlies resistance of AML cells to TNF-induced apoptosis. *Blood.* 2008;111(7):3793–801. doi: 10.1182/blood-2007-07-104042.
- Shan Y, Pepe J, Lu TH, et al. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys.* 2000;380(2):219–27.
- Yang G, Nguyen X, Ou J, et al. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood.* 2001;97(5):1306–13. doi: 10.1182/blood.v97.5.1306.
- Hou W, Shan Y, Zheng J, et al. Zinc mesoporphyrin induces rapid and marked degradation of the transcription factor Bach1 and up-regulates HO-1. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1779(3):195–203. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.01.006.
- Davudian S, Mansoori B, Shajari N, et al. BACH1, the master regulator gene: A novel candidate target for cancer therapy. *Gene.* 2016;588(1):30–7. doi: 10.1016/j.gene.2016.04.040.
- Zhang X, Guo J, Wei X, et al. Bach1: Function, Regulation, and Involvement in Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1–8. doi: 10.1155/2018/1347969.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, et al. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* 2002;21(19):5216–24. doi: 10.1093/emboj/cdf516.
- Ogawa K, Sun J, Taketani S, et al. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* 2001;20(11):2835–43. doi: 10.1093/emboj/20.11.2835.
- Suzuki H, Tashiro S, Hira S, et al. Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* 2004;23(13):2544–53. doi: 10.1038/sj.emboj.7600248.
- Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Bonkovsky HL. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* 2006;20(14):2651–3. doi: 10.1096/fj.06-6346.fj.
- Suzuki H, Tashiro S, Sun J, et al. Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* 2003;278(49):49246–53. doi: 10.1074/jbc.M306764200.
- Heck D, Vetrano A, Mariano T, et al. UVB light stimulates production of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22432–6. doi: 10.1074/jbc.C300048200.
- Grasso S, Scifo C, Cardile V, et al. Adaptive responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(5):491–8. doi: 10.1177/15353702-0322805-12.
- Ji K, Fang L, Zhao H, et al. Ginger Oleoresin Alleviated γ -Ray Irradiation-Induced Reactive Oxygen Species via the Nrf2 Protective Response in Human Mesenchymal Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–12. doi: 10.1155/2017/1480294.
- Chow JM, Shen SC, Huan SK, et al. Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(12):1839–51. doi: 10.1016/j.bcp.2005.03.017.
- Cao H, Wang Y, Wang Q, et al. Taxol prevents myocardial ischemia-reperfusion injury by inducing JNK-mediated HO-1 expression. *Pharm Biol.* 2016;54(3):555–60. doi: 10.3109/13880209.2015.1060507.
- Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(17):3221–47. doi: 10.1007/s00018-016-2223-0.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89–116. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(2):313–22. doi: 10.1006/bbrc.1997.6943.
- Reichardt JF, Motz GT, Puga A. Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucl Acids Res.* 2007;35(21):7074–86. doi: 10.1093/nar/gkm638.

50. Sun J, Brand M, Zenke Y, et al. Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(6):1461–6. doi: 10.1073/pnas.0308083100.
51. Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(3):688–92. doi: 10.1073/pnas.88.3.688.
52. Lin JJ, Daniels-McQueen S, Gaffield L, et al. Specificity of the induction of ferritin synthesis by hemin. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1050(1–3):146–50. doi: 10.1016/0167-4781(90)90156-v.
53. Sheftel AD, Kim SF, Ponka P. Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2007;282(14):10480–6. doi: 10.1074/jbc.m700240200.
54. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002;99(10):3505–16. doi: 10.1182/blood.v99.10.3505.
55. Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, et al. Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2000;20(16):5818–27. doi: 10.1128/mcb.20.16.5818-5827.2000.
56. Pietsch EC, Chan JY, Torti FM, Torti SV. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2361–9. doi: 10.1074/jbc.m210664200.
57. Munro HN. Iron regulation of ferritin gene expression. *J Cell Biochem*. 1990;44(2):107–15. doi: 10.1002/jcb.240440205.
58. Kato J, Kobune M, Ohkubo S, et al. Iron/IRP-1-dependent regulation of mRNA expression for transferrin receptor, DMT1 and ferritin during human erythroid differentiation. *Exp Hematol*. 2007;35(6):879–87. doi: 10.1016/j.exphem.2007.03.005.
59. Cermak J, Balla J, Jacob HS, et al. Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy. *Cancer Res*. 1993;53(21):5308–13.
60. Regan RF, Kumar N, Gao F, Guo Y. Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience*. 2002;113(4):985–94. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00243-9.
61. Lanceta L, Mattingly JM, Li C, Eaton JW. How Heme Oxygenase-1 Prevents Heme-Induced Cell Death. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134144. doi: 10.1371/journal.pone.0134144.
62. Lin F, Girotti AW. Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: antisense determination of ferritin involvement. *Arch Biochem Biophys*. 1998;352(1):51–8. doi: 10.1006/abbi.1998.0588.
63. Gozzelino R, Soares MP. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(11):1754–69. doi: 10.1089/ars.2013.5666.
64. Петрова Е.Г., Борисенкова С.А., Калия О.Л. Окисление аскорбиновой кислоты в присутствии фталоцианиновых комплексов металлов и химические аспекты каталитической терапии рака: научное издание. Сообщение 2. Катализ октакарбокисфталоцианином кобальта. Продукты реакции. *Известия РАН. Серия химическая*. 2004;10:2224–7.
[Petrova EG, Borisenkova SA, Kaliya OL. Oxidation of ascorbic acid in the presence of phthalocyanine metal complexes and chemical aspects of catalytic therapy of cancer. 2. Catalysis by cobalt octacarboxyphthalocyanine. Reaction products. *Izvestiya RAN. Seriya khimicheskaya*. 2004;10:2224–7. (In Russ)]
65. 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». *Клиническая онкогематология*. 2014;7(3):282–9.
[Sidорова TA, Vagida MS, Kaliya OL, Gerasimova GK. Role of Catalase in Protection of Cancer Cells from Oxidative Stress Induced by Binary Catalytic System “Teraphtal + Ascorbic Acid”. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014;7(3):282–9. (In Russ)]
66. 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.
67. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
68. Alves LR, Costa ES, Sorgine MH, et al Heme-oxygenases during erythropoiesis in K562 and human bone marrow cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e21358. doi: 10.1371/journal.pone.0021358.
69. Ding Y, Zhang YZ, Furuyama K, et al. Down-regulation of heme oxygenase-2 is associated with the increased expression of heme oxygenase-1 in human cell lines. *FEBS J*. 2006;273(23):5333–46.
70. Miyazaki T, Kirino Y, Takeno M, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1. *Cancer Sci*. 2010;101(6):1409–16. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01550.x.
71. Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem*. 2006;281(44):33761–72. doi: 10.1074/jbc.m604748200.
72. Ma J, Yu KN, Cheng C et al. Targeting Nrf2-mediated heme oxygenase-1 enhances non-thermal plasma-induced cell death in non-small-cell lung cancer A549 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2018;658:54–65. doi: 10.1016/j.abb.2018.09.015.
73. Okabe-Kado J, Hayashi M, Honma Y, Hozumi M. Enhancement by hemin of the sensitivity of K562 human leukemic cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res*. 1986;46(3):1239–43.
74. Honma Y, Onozuka Y, Okabe-Kado J, et al. Hemin enhances the sensitivity of erythroleukemia cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine by both activation of deoxycytidine kinase and reduction of cytidine deaminase activity. *Cancer Res*. 1991;51(17):4535–8.
75. Cheong JW, Kim Y, Eom JI, et al. Enhanced autophagy in cytarabine arabinoside-resistant U937 leukemia cells and its potential as a target for overcoming resistance. *Mol Med Rep*. 2016;13(4):3433–40. doi: 10.3892/mmr.2016.4949.
76. Mucha O, Podkalicka P, Czarnek M, et al. Pharmacological versus genetic inhibition of heme oxygenase-1 – the comparison of metalloporphyrins, shRNA and CRISPR/Cas9 system. *Acta Biochim Pol*. 2018;65(2):277–86. doi: 10.18388/abp.2017_2542.
77. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood*. 2009;114(20):4546–51. doi: 10.1182/blood-2009-05-224188.