

# ЗНАЧЕНИЕ БАЗАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕМОКСИГЕНАЗЫ-1 ДЛЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ *IN VITRO*

Т.А. Сидорова, Э.Ш. Соломко, Ю.А. Хоченкова, А.А. Прокофьева, Д.А. Хоченков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Татьяна Александровна Сидорова tatsid@yahoo.com

**Введение.** Молекулярная основа механизма действия радио- и фотодинамической терапии, а также ряда противоопухолевых химиопрепаратов — окислительный стресс (OS). Фермент гемоксигеназа-1 (HO-1), молекулярный маркер OS — ключевой участник системы защиты и адаптации опухолевых клеток в условиях стресса.

**Цель исследования** — выяснить, зависит ли чувствительность опухолевых клеток меланомы человека к OS от базального и индуцированного модуляторами уровня экспрессии гена HO-1.

**Материалы и методы.** В работе были использованы опухолевые клетки меланомы человека разных линий. Экспрессию мРНК HO-1 в клетках изучали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени, содержание активных форм кислорода в клетках — методом проточной цитометрии, цитотоксичность препаратов — с применением МТТ-метода.

**Результаты.** По нашим данным, клетки меланомы человека имеют разные по величине базальные уровни транскрипции HO-1: высокий (3,0–3,5 о. е.) у линий MelIL, MelP, средний (1,5 о. е.) у линий MeWo, MelZ, MelIbr и низкий (0,5 о. е.) у MelMe, A375. Установлено, что чувствительность клеток к  $H_2O_2$ , индуктору OS, не зависит от величины базальной экспрессии HO-1. Гемининдуцированное увеличение базальной экспрессии HO-1 обнаружено только в клетках меланомы со средним (MeWo) и низким (A375) уровнями этого параметра и сопровождается увеличением их устойчивости к  $H_2O_2$  (в 2 раза). Определено, что репрессия HO-1 в присутствии апигенина регистрируется в клетках меланомы с разным базальным уровнем, однако сенситизация к  $H_2O_2$  (2–4 раза) наблюдалась только для клеток со средним (MeWo) и низким (A375) уровнями базальной экспрессии HO-1. Выявлено, что снижение базальной экспрессии HO-1, индуцированное апигенином, сопровождается увеличением содержания активных форм кислорода в клетках и вносит вклад в увеличение чувствительности их к  $H_2O_2$ .

**Заключение.** Результаты нашего исследования показывают значение природного флавонола апигенина в качестве модулятора экспрессии HO-1.

**Ключевые слова:** меланома человека, гемоксигеназа-1, гемин, апигенин

**Для цитирования:** Сидорова Т.А., Соломко Э.Ш., Хоченкова Ю.А. и др. Значение базальной экспрессии гемоксигеназы-1 для чувствительности клеток меланомы человека к окислительному стрессу *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):38–45.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-38-45



## THE VALUE OF BASAL EXPRESSION LEVEL OF HEMOXYGENASE-1 FOR SENSITIVITY OF HUMAN MELANOMA CELLS TO OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

T.A. Sidorova, E.Sh. Solomko, Yu.A. Khochenkova, A.A. Prokofieva, D.A. Khochenkov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** The molecular basis of radio- and photodynamic therapy (PDT), the mechanism of action of a number of antitumor chemotherapy drugs is oxidative stress (OS). The enzyme hemoxygenase-1 (HO-1), a molecular marker of OS, is a key participant in the system of protection and adaptation of tumor cells under stress.

**Objective.** To find out whether the sensitivity of human melanoma tumor cells to OS depends on the basal and modulator-induced levels of HO-1 expression

**Material and methods.** Human melanoma cell lines were used in the study. The expression of mRNA HO-1 in cells was studied by real-time RT-PCR, the reactive oxygen species content in cells — by flow cytometry and the cytotoxicity of drugs — by MTT assay.

**Results.** According to our data, human melanoma cells have different basal levels of *HO-1* transcription: high (3.0–3.5 o. u.) in lines *MelIL*, *MelP*, medium (1.5 o. u.) in lines *MeWo*, *MelZ*, *MelIbr* and low (0.5 o. e.) – *MelMe*, *A375*. There is no direct correlation between the level of basal cell expression of *HO-1* and their sensitivity to the OS inducer –  $H_2O_2$ . The hemin-induced increase in *HO-1* expression in cells is accompanied by doubled resistance to  $H_2O_2$ . It was found that *HO-1* repression in the presence of apigenin was registered in melanoma cells with different basal levels, but sensitization to  $H_2O_2$  (2–4 times) was observed only for cells with medium (*MeWo*) and low (*A375*) levels of basal *HO-1* expression. It was found that the decrease in basal expression of *HO-1* induced by apigenin is accompanied by an increase in the reactive oxygen species content in cells.

**Conclusions.** The results of our research allow us to recommend natural flavon apigenin, a modulator of *HO-1* expression, for inclusion in the chemotherapy and PDT regimens to increase the effectiveness of human melanoma treatment.

**Key words:** human melanoma cell lines, hemoxygenase-1, hemin, apigenin

**For citation:** Sidorova T.A., Solomko E.Sh., Khochenkova Yu.A. et al. The value of basal expression level of hemoxygenase-1 for sensitivity of human melanoma cells to oxidative stress in vitro. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3):38–45. (In Russ.).

## Введение

Меланома кожи (МК) – распространенное злокачественное новообразование кожных покровов, которое обладает способностью быстро метастазировать и слабой чувствительностью к химиотерапии вследствие активирующих мутаций, что определяет причину высокой смертности больных [1]. В основе низкой эффективности химиотерапии МК лежит исходная устойчивость опухолевых клеток к цитостатикам: алкилирующим препаратам (дакарбазин, темозоломид), препаратам платины, винкалкалоидам [2]. Полагают, что молекулярные механизмы исходной устойчивости клеток меланомы к химиотерапии приобретаются в процессе опухолевого патогенеза и могут быть связаны с воздействием внешних факторов, в первую очередь ультрафиолетового (УФ) излучения. Установлено, что молекулярно-биологические изменения в меланоцитах, индуцированные УФ-излучением, играют роль в развитии МК [3]. УФ-излучение, взаимодействуя с эндогенными хромофорами, такими как нуклеиновые кислоты, белки, порфирины, флавины и меланин, становится триггером биологических процессов в клетках кожи: специфических мутаций и окислительного стресса (OS), развивающегося в клетке вследствие нарушения баланса окислителей-восстановителей.

Эндогенные хромофоры – источники активных форм кислорода (ROS), таких как супероксид-анион ( $O_2^{\cdot-}$ ), радикал гидроксила ( $OH^{\cdot}$ ) и  $H_2O_2$ . Известно, что ROS при низких концентрациях становятся медиаторами в сигнальных процессах клетки [4], но их гиперпродукция может привести к активации этих путей, вызывая стимуляцию пролиферации или апоптоз [5]. Полагают, что ROS как регуляторы сигнальных путей клетки могут быть вовлечены в патогенез меланомы [6].

В условиях длительного стресса (УФ), сопровождаемого накоплением ROS в клетках, вырабатываются защитные механизмы, необходимые для их адаптации и выживания. Развитие OS сопровожда-

ется повреждением гемопротеинов, и, как следствие, в клетке появляется «свободный» гем. Для защиты от избытка «гемового» железа в клетке активируется система гемоксигеназа-1 (HO-1)/ферритин (Ft). Установлено, что УФ является индуктором экспрессии HO-1 (мРНК/белка) в опухолевых клетках [7].

Можно предположить, что в ходе адаптации к стрессорному УФ-воздействию меланоциты, предшественники меланомы, приобретают для защиты от OS конститутивно-активную систему *HO-1/Ft* с «канонической» функцией, участвующей в поддержании гомеостаза внутриклеточного пула железа. Кроме того, нельзя исключить существование в клетках меланомы «неканонических» изоформ HO-1, которые в ряде опухолевых клеток вовлечены в регуляцию транскрипции генов (ядерная изоформа HO-1) [8] или в пролиферативную активность (цитоплазматический вариант HO-1, индуцируемый ультрафиолетом) [9].

Ранее нами было показано, что миеломонобласты человека линии U937, имеющие базальный уровень экспрессии *HO-1*, оказались в 2 раза устойчивее к воздействию  $H_2O_2$  по сравнению с эритробластами линии K562, в которых исходно транскрипция *HO-1* заблокирована. В условиях активации системы HO-1/Ft геминном (FePPIX), сопровождаемой увеличением экспрессии *HO-1* и *Ft*, цитотоксичность  $H_2O_2$  для лейкозных клеток линии U937 снижается [10]. В настоящей работе мы попытались выяснить, существует ли связь между уровнем экспрессии *HO-1* в опухолевых клетках и их чувствительностью к OS.

**Цель настоящей работы** – исследовать значение уровня транскрипции гена *HO-1* для чувствительности клеток меланомы человека к OS. Нам предстояло определить базальный уровень экспрессии *HO-1* в клетках меланомы человека разных линий, сопоставить величину базальной экспрессии *HO-1* с чувствительностью клеток к  $H_2O_2$ , индуктором OS, выяснить, влияет ли модуляция базальной экспрессии *HO-1* (up-регуляция геминном и down-регуляция

апигенином (Api)) в клетках меланомы на их чувствительность к  $H_2O_2$ .

### Материалы и методы

В работе были использованы препараты и химические соединения: TRIzol, MTT,  $H_2O_2$ , FePPIX, Api, 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA), Hepes, PBS (Sigma, США), дакарбазин (Veropharm, Россия); ферменты: обратная транскриптаза M-MuLV, полимераза Tag, реакционные буферы (Fermentas, Литва); смесь дезоксинуклеотидов, гексамеры, праймеры для генов синтезированы в компании «Литех» (Россия).

В исследовании использованы культуры клеток меланомы человека линий MelIL, MelP, MelZ, MelIBR, MeWo, MelM, A375 и немелкоклеточного рака легкого линии A549. Для поддержания линий и проведения исследований клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10 % ЭТС, 2 mM glutamin и антибиотики (стрептомицин и пенициллин).

### Исследование жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* MTT-методом

Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован MTT-метод, подробно описанный в работе Т.А. Сидоровой и соавт. [11]. Величина  $IC_{50}$  — критерий цитотоксичности исследованных препаратов — определена с помощью метода численных решений по 3 экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля 1-й производной экспериментальной кривой выживаемости клеток и представлена в виде  $M \pm SD$ . Для оценки эффективности модулятора (М) в комбинации с препаратами использован индекс резистентности (IR), равный отношению:  $IC_{50}$  (препарат + М)/ $IC_{50}$ -препарат. Величина  $IR > 1,0$  в присутствии нецитотоксических концентраций М (выживаемость клеток не ниже 80 % по сравнению с контрольными клетками) свидетельствовала о снижении чувствительности клеток к химиопрепарату, а величина  $IR < 1,0$  — об увеличении чувствительности (сенситизации) клеток.

### Исследование экспрессии генов HO-1 и Ft (FHC) в опухолевых клетках методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией 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  $1 \times 10^6$  клеток в соответствии со стандартной методикой. Концентрацию РНК определяли с помощью Quant-IT RNA Assay Kit по 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 42 °C в течение 70 мин. Обратную транскриптазу (ревертазу) инактивировали нагреванием реакционной смеси до 85 °C в течение 5 мин. Контроль обратной транскрипции проводили при отсутствии обратной транскриптазы.

### Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественная полимеразная цепная реакция (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 ( $\beta$ -актину и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы). ПЦР-реакционная смесь содержала 2 мкл (50 нг) кДНК и 5 пикомоль праймеров, последовательности которых представлены в табл. 1.

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

Название гена Gene name	Последовательность прямого (F)/ обратного (R) праймеров Forward (F)/Reverse (R) primer sequence	Размер продукта Product size
HO-1	F: 5'-CGGGCCAG CAACAAAGTG-3' R: 5'-AGTGTAAGGA CCCATCGGAGAA-3'	107 п. н. 107 п. п.
hFHC	F: 5'-GTAACGCCAGT TCACCATCAGGAGTACT-3' R: 5'-TTTCCAAATGTAATGC ACACTCCATT-3'	276 п. н. 276 п. п.
GAPDH	F: 5'-GGGGAGCCAAAG GGTCATCATCT-3' R: 5'-GACGCCTGCTTCACC ACCTTCTTG-3'	212 п. н. 212 п. п.
$\beta$ -actin	F: 5'-GTGGGGCGCCCC AGGCACCA-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCAC GCACGATTTC-3'	201 п. н. 201 п. п.

Условия амплификации: предварительная обработка: 5 мин при 95 °C, последующие 39 циклов: 95 °C — 5 с; 60 °C — 30 с; 72 °C — 30 с. Анализ кривых плавления проводили путем детекции флуоресценции при постепенном нагревании образцов до 95 °C с шагом 0,5 °C в секунду. Все образцы анализировались в триплетах в 96-луночных низкопрофильных планшетах. Результаты количественной ПЦР с обратной транскрипцией представлены 2-й производной от среднего значения

порогового цикла в триплете для каждого образца ( $\Delta\Delta Ct$ ).

#### Исследование внутриклеточного уровня ROS

Базальный и индуцированный препаратами (Ari,  $H_2O_2$ ) уровни ROS в клетках определяли с помощью красителя DCFH-DA согласно методике, описанной ранее [10]. Клетки рассеивали на 6-луночные планшеты в концентрации  $500 \times 10^5/3$  мл среды, после образования моно слоя (12 ч) в соответствующие лунки добавляли Ari (35 мкМ),  $H_2O_2$  (100, 400 мкМ) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 %  $CO_2$  в течение 4 ч. После инкубации питательную среду удаляли из лунок, клетки открепляли от подложки с помощью раствора Версена и ресуспендировали в буфере (20 мМ HEPES в PBS), переносили в пробирки типа «Эппендорф», центрифугировали 5 мин при 1800 об/мин и 10 °С. Клетки промывали в 2 мл буфера, центрифугировали и ресуспендировали в 0,5 мл буфера.

Анализ проводили на проточном цитометре Novocyt 2000R (ACEA Biosciences Inc., США), собирая  $2 \times 10^4$  событий в анализируемый гейт. Интенсивность флуоресценции регистрировали путем установки маркера по отношению к контрольному материалу при  $\lambda_{ex} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 530$  нм.

#### Результаты и обсуждение

##### Исследование роли базальной экспрессии *HO-1* в клетках меланомы человека разных линий в защите их от OS

Чтобы выяснить, зависит ли чувствительность клеток меланомы человека к OS от уровня базальной экспрессии *HO-1*, мы определили ее экспрессию на 7 клеточных линиях меланомы человека: MelIL, MelP, MelZ, IBR, MeWo, MelM, A375 (см. табл. 1).

По нашим данным, клетки меланомы человека этих линий имеют разные по величине базальные уровни экспрессии *HO-1* (рис. 1). По величине этого параметра можно выделить 3 типа клеток меланомы: с высоким (3–3,5 о. е.) уровнем базальной экспрессии – MelIL, MelP, средним (1,5 о. е.) – MelZ, IBR, MeWo и низким (0,5 о. е.) – MelMe, A375.

Для дальнейших исследований мы выбрали 3 линии клеток, представляющие 3 типа базального уровня экспрессии *HO-1*: MelIL, MeWo и A375, и определили их чувствительность к  $H_2O_2$ , индуктору OS (табл. 2).

Данные получены из 5 независимых экспериментов и представлены в виде среднего ( $\pm$  SD).

Оказалось, что токсичность  $H_2O_2$  для клеток с низким уровнем базальной экспрессии *HO-1* (A375) была в 2 раза выше ( $54 \pm 8$  мкМ) по сравнению с клетками со средним уровнем экспрессии (MeWo)  $IC_{50}(H_2O_2) = 24 \pm 3$  мкМ. Однако дальнейшее снижение чувствительности к  $H_2O_2$  не наблюдалось в клетках с высоким уровнем экспрессии *HO-1* (MelIL)  $IC_{50}$

( $H_2O_2$ ) =  $48 \pm 1$  мкМ. Эти данные свидетельствуют об отсутствии прямой корреляции между уровнем экспрессии *HO-1* и чувствительностью к OS, индуцированному  $H_2O_2$ . В то же время результаты наводят на мысль, что в клетках с высоким уровнем экспрессии *HO-1*, по-видимому, пул мРНК *HO-1* предназначен скорее не для *HO-1* белка с канонической функцией (поддержание гомеостаза железа в клетке), а для изоформ белка, участвующих в регуляции транскрипции генов [8].

##### Исследование роли гемининдуцированной экспрессии *HO-1* в защите клеток меланомы от OS

По данным, полученным ранее, система *HO-1/Ft*, чувствительная к регуляции гемом (исходно активная), играет роль в защите лейкозных клеток от OS, индуцированного  $H_2O_2$  [10]. Принимая во внимание эти сведения, мы исследовали способность FePPIX, известного индуктора *HO-1*, вызывать up-регуляцию *HO-1/Ft* в клетках меланомы человека с разным базальным уровнем экспрессии мРНК *HO-1* (рис. 2).

Согласно данным, представленным на рис. 2а, в присутствии FePPIX базальный уровень экспрессии *HO-1* увеличивается в 2 раза в клетках со средним (MeWo) и низким уровнями экспрессии *HO-1* (A375) и не изменяется в клетках с исходно высоким уровнем экспрессии *HO-1* (MelIL). Известно, что цитопротекторный эффект системы *HO-1/Ft* обеспечивается коэкспрессией Ft, преимущественно белка тяжелой цепи – FHC. Именно FHC благодаря феррооксидантной активности контролирует прооксидантный эффект лабильного железа, освобожденного из гема. Согласно нашим данным, представленным на рис. 2б, транскрипция гена *FHC* снижается (в 1,5 раза) в клетках MeWo, увеличивается (в 2 раза) в клетках меланомы A375 и не изменяется в клетках MelIL. Таким образом, по аналогии с лейкозными клетками линии U937 (рис. 2а, б) клетки меланомы линии A375 обладают исходно активной системой *HO-1/Ft* (на уровне мРНК). Down-регуляция *FHC*, наблюдаемая в присутствии FePPIX в клетках MeWo, может также

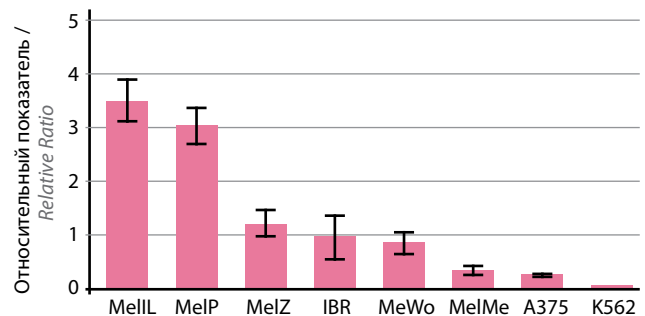


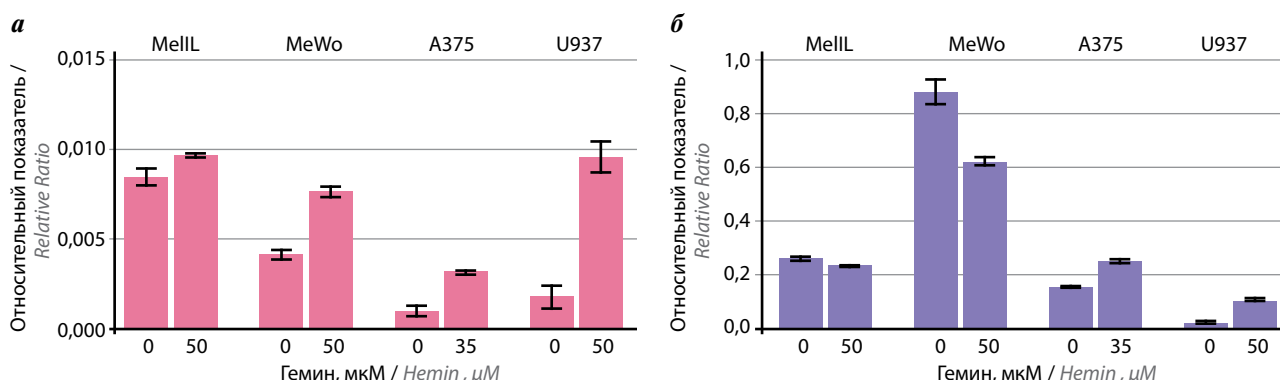
Рис. 1. Базальный уровень экспрессии *HO-1* в клетках разных линий меланомы человека

Fig. 1. The level of *HO-1* basal expression into human melanoma cell lines



Таблица 2. Влияние модуляторов базальной экспрессии *HO-1* на чувствительность клеток меланомы человека к  $H_2O_2$ Table 2. The influence of modulator induced *HO-1* basal expression on the sensitivity of human melanoma cells to  $H_2O_2$ 

Линия клеток меланомы человека Human melanoma cell line	$IC_{50} H_2O_2 \pm M/IR$ (мкМ) $IC_{50} H_2O_2 \pm M/IR$ ( $\mu M$ )			$IC_{50} M$ (мкМ) $IC_{50} M$ ( $\mu M$ )	
	–M	+M		FePPIX	Api
	–	+FePPIX	+Api		
A375	24 ± 3	58 ± 6 (2,4 ± 0,5)	17 ± 2 (0,6)	75 ± 6	35 ± 2
MeWo	54 ± 8	96 ± 11 (2,2 ± 0,4)	50 ± 0,5 (0,8)	>100	>100
MelIL	48 ± 1	62 ± 6 (1,3 ± 0,1)	47 ± 2 (1)	>100	>100

Рис. 2. Влияние гемина на экспрессию *HO-1* (а) и *FHC* (б) в клетках меланомы человекаFig. 2. The influence of hemin on *HO-1* (a) and *FHC* (б) gene expression into human melanoma cell lines

свидетельствовать о наличии в них исходно системы *HO-1/Ft*, чувствительной к регуляции гемом. Поскольку промотор гена *Ft* имеет регуляторные участки, чувствительные к железу «гемовой» природы [12, 13], по-видимому, конечный эффект будет зависеть от вида клеток и/или их внутриклеточного контекста.

Влияет ли индукция экспрессии *HO-1* гемом на чувствительность клеток меланомы к  $H_2O_2$ ? Как показано в табл. 2, в условиях активации *HO-1/Ft* FePPIX (35–50 мкМ в течение 5 ч) величина  $IC_{50} H_2O_2$  увеличивалась в 2 раза для клеток линий A375 и MeWo и не изменилась для клеток линии MelIL.

Таким образом, токсичность  $H_2O_2$ , индуктора OS, снижается для клеток меланомы, обладающих исходно активной системой *HO-1/Ft*, чувствительной к внутриклеточной концентрации гема. В клетках линии MelIL система *HO-1/Ft* не регулируется гемом, что может свидетельствовать о наличии в этих клетках изоформ *HO-1*, не участвующих в поддержании гомеостаза «гемового» железа.

#### Исследование чувствительности клеток меланомы к OS в условиях down-регуляции базальной экспрессии *HO-1*

По данным литературы, базальный уровень экспрессии *HO-1* (мРНК/белка) влияет на чувствительность опухолевых клеток к агентам стрессорной

природы: снижение уровня базальной экспрессии *HO-1* путем нокаута *HO-1* с использованием siRNA приводит к увеличению токсичности препаратов [14, 15]. Кроме нокаута *HO-1*, снижение базальной экспрессии *HO-1* (мРНК/белка) в клетках наблюдается в присутствии флавоноидов Ари [16]. В настоящей работе мы использовали Ари в качестве репрессора базальной экспрессии *HO-1*.

По данным, представленным на рис. 3а, в условиях предварительной инкубации опухолевых клеток с Ари 35–50 мкМ в течение 5 ч наблюдается резкое снижение базального уровня экспрессии *HO-1* в клетках меланомы линий MelIL и MeWo в 8 и 4 раза соответственно. Аналогичный эффект (снижение экспрессии *HO-1*) отмечается и для клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549 с исходно высоким уровнем базальной экспрессии *HO-1* (в 6 раз).

Базальный уровень экспрессии *HO-1* также снижается в клетках меланомы линии A375 (в 2 раза), по-видимому, высокая токсичность Ари для этих клеток (см. табл. 2) не позволила увеличить эффективность данного модулятора в качестве репрессора синтеза мРНК *HO-1*.

Согласно результатам исследования, в этих же условиях Ари не влияет на уровень экспрессии *FHC* (рис. 3б), что свидетельствует о специфическом

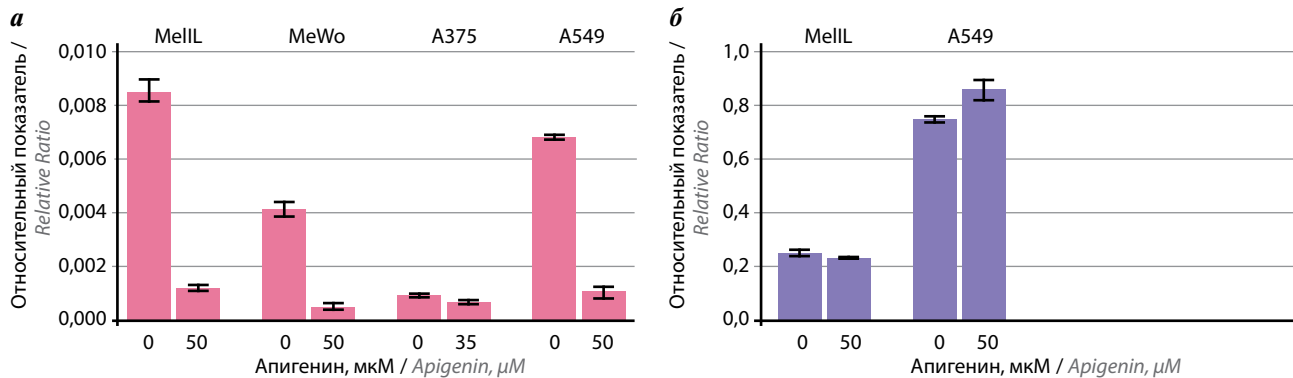


Рис. 3. Влияние апигенина на экспрессию *HO-1* (а) и *FHC* (б) в клетках меланомы человека

Fig. 3. The influence of apigenin on *HO-1* (a) and *FHC* (б) gene expression into human melanoma cell lines

влиянии флавона на экспрессию *HO-1* и согласуется с данными литературы [16].

Чтобы выяснить, изменится ли чувствительность клеток меланомы к  $H_2O_2$  после инкубации с Арі, мы исследовали их выживаемость в этих условиях. По данным, представленным в табл. 2, в условиях down-регуляции *HO-1*, индуцированной Арі, чувствительность к  $H_2O_2$  повышалась в 2 раза для клеток линии A375 ( $IR = 0,6$ ), умеренная сенситизация отмечалась для клеток меланомы линии MeWo ( $IR = 0,8$ ), и инкубация с Арі не повлияла на чувствительность к  $H_2O_2$  клеток линии MelIL, несмотря на резкое снижение базального уровня экспрессии *HO-1* в этих клетках. Также мы не наблюдали изменения чувствительности к  $H_2O_2$  для клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549 (данные не представлены).

Таким образом, в условиях down-регуляции *HO-1*, индуцированной Арі, чувствительность к  $H_2O_2$  повышается для клеток с низким (A375) и средним (MeWo) исходными уровнями базальной экспрессии *HO-1*. Эти данные свидетельствуют о том, что репрессия синтеза мРНК *HO-1* в присутствии Арі — необходимое, но недостаточное условие для сенситизации клеток к  $H_2O_2$ .

В настоящее время известно, что в клетках после воздействия Арі наблюдается угнетение базальной экспрессии белков стресса: *HO-1* [16], индуцибельной *NO*-синтазы, циклооксигеназы 2-го типа [17]. Однако до сих пор механизм этого эффекта флавоноа остается неизвестным. Мы предположили, что down-регуляция белка *HO-1*, входящего в систему защиты клеток от OS, может отразиться на балансе окислителей-восстановителей в них и определили содержание ROS в клетках меланомы линии A375 после инкубации их с Арі.

#### Возрастание внутриклеточного содержания ROS в клетках меланомы A375 после воздействия Арі в комбинации с $H_2O_2$

По данным, представленным на рис. 4, краткосрочное воздействие  $H_2O_2$ , индуктора ROS (400 мкМ,

30 мин), приводит к снижению концентрации последнего в клетках (см. рис. 4а, 2), о чем свидетельствует сдвиг пика кривой люминесценции влево. Вероятно, этот эффект обусловлен активацией системы детоксикации  $H_2O_2$ . После воздействия Арі в течение 5 ч в клетках меланомы линии A375 содержание ROS возрастает (рис. 4б, 2) по сравнению с контрольными клетками (рис. 4б, 1). В этих же условиях добавление к клеткам  $H_2O_2$  привело к резкому возрастанию содержания внутриклеточного ROS (рис. 4в, 3) по сравнению и с контрольными клетками (без препаратов), и с вариантами, обработанными  $H_2O_2$  (рис. 4а, 2).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что после инкубации с Арі в клетках меланомы линии A375 баланс окислителей-восстановителей сдвигается в сторону окислителей и обеспечивает их сенситизацию к воздействию  $H_2O_2$ . Известно, что в механизме цитотоксичности дакарбазина (DTIC), применяемого для лечения меланомы человека, участвуют ROS [18, 19]. С учетом этой информации представляло интерес выяснить, изменится ли чувствительность клеток меланомы линии A375 к DTIC после предварительной инкубации с Арі.

Как показано на рис. 5, в условиях репрессии *HO-1*, индуцированной Арі (35 мкМ, 5 ч), чувствительность клеток линии A375 к DTIC увеличивается. Способность Арі сенситизировать клетки меланомы к химиопрепаратам, в цитотоксичность которых вносят вклад ROS, позволяет рекомендовать этот флавоноид для включения его в схему лечения больных меланомой.

#### Заключение

Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что в клетках меланомы человека регистрируется базальный уровень транскрипции гена *HO-1*, величина которого варьирует для разных линий: MelIL = MelP > MeWo = MelZ = IBR > MelMe = A375. Несмотря на отсутствие прямой корреляции между уровнем

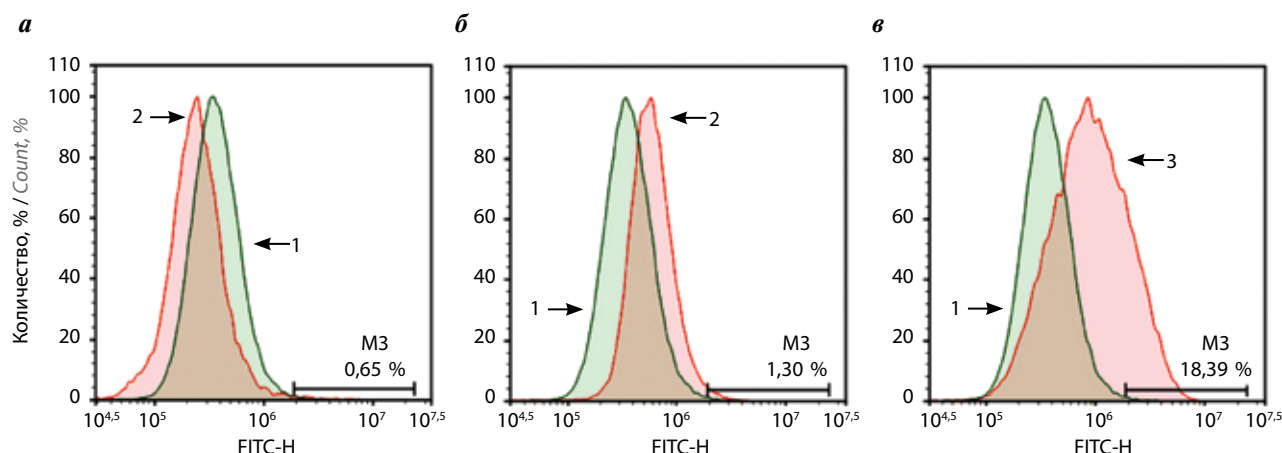


Рис. 4. Содержание ROS в клетках меланомы линии A375 после воздействия  $H_2O_2$  (а), апигенина (б), апигенина и  $H_2O_2$  (в)

Fig. 4. ROS content in A375 melanoma cells after exposure to  $H_2O_2$  (a), apigenin (б), apigenin and  $H_2O_2$  (в)

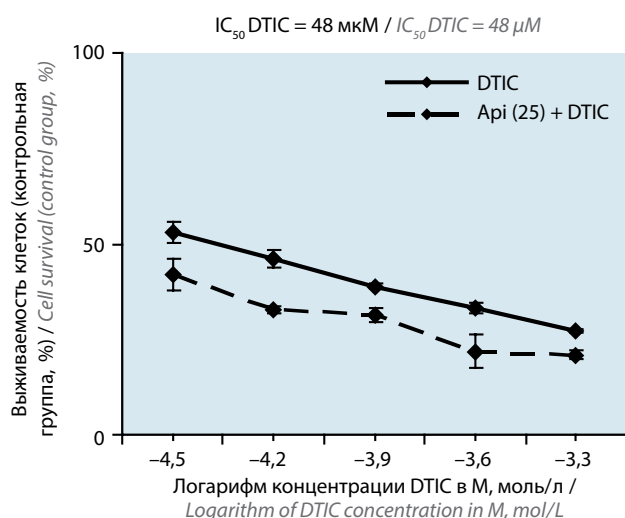


Рис. 5. Токсичность дакарбазина (DTIC) для клеток меланомы линии A375 в условиях апигенининдуцированной репрессии транскрипции *HO-1*

Fig. 5. Dacarbazine (DTIC) toxicity for A375 melanoma cells in conditions apigenin-induced repression of *HO-1* transcription

базальной экспрессии *HO-1* в клетках и их чувствительностью к  $H_2O_2$ , индуктору OS, отмечается, что клетки линии A375 с низким уровнем транскрипции *HO-1* оказались в 2 раза чувствительнее к  $H_2O_2$  по сравнению с клетками линии MeWb, имеющими высокий уровень экспрессии этого гена. Гемининдуцированное увеличение экспрессии *HO-1* наблюдается только в клетках со средним (MeWb) и низким (A375) уровнями транскрипции гена и коррелирует с увеличением их устойчивости к  $H_2O_2$ . Установлено, что апигенининдуцированная репрессия синтеза мРНК *HO-1* регистрируется в клетках меланомы с разным базальным уровнем, однако сенситизация клеток к  $H_2O_2$  характерна для вариантов, имеющих средний (MeWb) и низкий (A375) уровни экспрессии этого гена.

Установлено, что способность Api самостоятельно генерировать в клетках ROS вносит вклад в механизм увеличения чувствительности клеток меланомы к  $H_2O_2$  в условиях апигенининдуцированной репрессии синтеза мРНК *HO-1*.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- MacKie R.M., Hauschild A., Eggermont A.M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. Ann Oncol 2009;20(Suppl 6):1–7. DOI: 10.1093/annonc/mdp252.
- Bhatia S., Tykodi S.S., Thompson J.A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. Oncology (Williston Park) 2009;23(6):488–96.
- Emri G., Paragh G., Tószaki Á. et al. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: an update. J Photochem Photobiol B 2018;185:169–75. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005.
- De Yúlia G.J.Jr., Cárcamo J.M., Bórquez-Ojeda O. et al. Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(14):5044–9. DOI: 10.1073/pnas.0501154102.
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. Int J Biochem Cell Biol 2000;32(2):157–70. DOI: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6.
- Wittgen H.G., van Kempen L.C. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. Melanoma Res 2007;17(6):400–9. DOI: 10.1097/cmr.0b013e3282fd312.
- Vile G.F., Tyrrell R.M. 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.
- 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.

9. Bian C., Zhong M., Nisar M.F. et al. A novel heme oxygenase-1 splice variant, 14 kDa 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.
10. 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. [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". *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2014;7(3):282–9. (In Russ.)].
11. 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. [Sidorova T.A., Ryabaya O.O., Prokofieva A.A., Khochenkov D.A. Heme oxygenase-1/ferritin in protection of leukemia cells from oxidative stress induced by catalytic system "teraphtal + ascorbic acid". *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2019;12(4):416–27. (In Russ.)].
12. Sheftel A.D., Kim S.F., 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.
13. Torti F.M., Torti S.V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002;99(10):3505–16. DOI: 10.1182/blood.v99.10.3505.
14. Kweon M.H., Adhami V.M., Lee J.S., 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.
15. Ma J., Yu K.N., 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.
16. Abate A., Yang G., Wong R.J. et al. Apigenin decreases hemin-mediated heme oxygenase-1 induction. *Free Radic Biol Med* 2005;39(6):711–8. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.020.
17. Raso G.M., Meli R., di Carlo G. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci* 2001;68(8):921–31. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00999-1.
18. Pourahmad J., Amirmostofian M., Kobarfard F., Shahraki J. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;65(1):89–96. DOI: 10.1007/s00280-009-1007-8.
19. De Oliveira Júnior R.G., Bonnet A., Braconnier E. et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem Toxicol* 2019;125:549–61. DOI: 10.1016/j.fct.2019.02.013.

#### Вклад авторов

Т.А. Сидорова: разработка концепции и дизайна статьи, сбор и обработка данных, подготовка рукописи;  
Э.Ш. Соломко, А.А. Прокофьева, Ю.А. Хоченкова, Д.А. Хоченков: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных.

#### Authors contributions

T.A. Sidorova: developing the concept and design of the article, data collection and processing, the preparation of the manuscript;  
E.Sh. Solomko, A.A. Prokofieva, Yu.A. Khochenkova, D.A. Khochenkov: data collection and processing, providing research materials, data analysis and interpretation.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Сидорова/T.A. Sidorova: <https://orcid.org/0000-0003-3498-061X>  
Э.Ш. Соломко/E.Sh. Solomko: <https://orcid.org/0000-0002-8070-4707>  
А.А. Прокофьева/A.A. Prokofieva: <https://orcid.org/0000-0002-5281-2559>  
Ю.А. Хоченкова/Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>  
Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИОКТР № АААА-А20-120021490101-1 «Разработка новых комплексных подходов к изучению механизмов злокачественной трансформации клеток, прогрессии и метастазирования опухолей».

**Financing.** The work was performed within the framework of NIOKTR No АААА-А20-120021490101-1 Development of new integrated approaches to the study of mechanisms of malignant cell transformation, progression and metastasis of tumors.

Статья поступила: 11.03.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 11.03.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.