

УДК 577.161.1: 576.385.5

©Шмараков, Катан

ИНДУКЦИЯ РЕТИНОИДАМИ ГИДРОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P450 КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

И.А. Шмараков, Н.В. Катан*

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича, кафедра
биохимии и биотехнологии, ул. Коцюбинского, 2, Черновцы, Украина 58000;
эл. почта: igor.shmarakov@gmail.com

На модели карциномы Герена исследовали взаимосвязь процессов роста злокачественного новообразования и обеспеченности организма витамином А. Показано, что восстановление витаминных А ресурсов авитаминозного организма с опухолью дозозависимо ($r=0,83$) модулирует темпы роста карциномы Герена. Морфологические параметры опухолевого роста в условиях различной обеспеченности организма витамином А (0–3000 МЕ) положительно коррелируют с *n*-гидроксилазной ($r=0,81$) и N-деметиلاзной ($r=0,49$) активностями системы цитохрома P450 карциномы Герена. Увеличение темпов роста карциномы Герена наряду с активацией гидроксилазной активности цитохрома P450 микросомальной фракции злокачественного новообразования, наблюдаемое как при введении гипердоз ретинилацетата, так и селективной транспортной липосомальной формы полностью *транс*-ретиноевой кислоты, указывает на стимулирующий эффект ретиноидов в интенсификации опухолевого роста.

Ключевые слова: ретиноиды, цитохром P450, карцинома Герена.

ВВЕДЕНИЕ. Витамин А и его природные и синтетические аналоги – ретиноиды – являются необходимыми факторами для нормального роста, развития и дифференциации [1, 2], модулируя экспрессию более 500 генов и участвуя в регуляции пролиферации и апоптоза клеток [3]. В отношении злокачественно трансформированных клеток в ряде работ показана противоопухолевая активность различных форм витамина А [4, 5]; в то же время существуют экспериментальные данные, указывающие на опухолестимулирующее влияние ретиноидов [6–8]. Опухолевый рост характеризуется высокой метаболической активностью трансформированных клеток и образованием значительных количеств токсических продуктов метаболизма, требующего высокого уровня активности компонентов клеточной системы детоксикации, ведущим элементом которой является микросомальная монооксигеназная система цитохромов P450 (CYPs) [9]. В то же время известно, что экспрессия определенных изоформ цитохрома P450 может быть индуцирована различными соединениями, зачастую являющимися или специфическими субстратами этих изоформ, или продуктами реакций других ферментов [10, 11]. В этом аспекте ретиноиды способны прямо (через активацию промотора, содержащего RARE (retinoic acid responsive element) в комплексе с рецепторами ретиноевой кислоты (RAR, RXR) и пролифераторов пероксисом (PPAR)) или опосредованно (выступая в качестве субстратов) способны индуцировать экспрессию определенных изоформ CYPs [10, 12],

* - адресат для переписки

которые, обезвреживая эндогенные и экзогенные токсические метаболиты и повышая таким образом жизнеспособность клеток, способны позитивно влиять на пролиферативные и ростовые процессы.

Цель работы – проанализировать взаимосвязь роста злокачественного новообразования на модели карциномы Герена и гидроксилазной активности цитохрома P450 в условиях различной обеспеченности организма витамином А.

МЕТОДИКА. В исследованиях использовали самок белых беспородных крыс с начальной массой 40-50 г. Животные (всего использовано 120) были размещены по три в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой. Вода и еда были доступны *ad libitum*. С целью исследования влияния обеспеченности витамином А на процессы онкогенеза у животных вызывали авитаминоз путём их содержания на полусинтетическом рационе, лишённом витамина А [13]. Через 6 недель у животных развивались морфологические признаки авитаминоза-А [14]: отсутствие прироста массы тела, или прирост менее 1 г на протяжении 4-х суток; остановка роста; нарушение зрения при визуальной оценке, изменения шерстяного покрова. Развитие авитаминоза, идентифицированное по морфологическим параметрам, подтверждалось установленным нами низким уровнем ретинола сыворотки крови опытных животных ($<0,35$ мкмоль/л), определенного флуоресцентным методом [15]. В качестве модели злокачественного новообразования использовали карциному Герена, трансплантацию которой осуществляли путём подкожного введения в область бедра 0,4 мл 30% суспензии опухолевых клеток в физрастворе. В последствии, экспериментальные животные были разделены на группы: группа I (+А/+А, контроль) – животные, до и после трансплантации карциномы Герена находившиеся на рационе с добавлением физиологических концентраций витамина А (ежедневно 30 МЕ); группа II (-А/-А) – животные, до и после трансплантации опухоли находившиеся на рационе, лишённом витамина А; группа III (-А/+А) – животные, до трансплантации находившиеся на диете, лишённой витамина А, а начиная с первого дня после трансплантации карциномы Герена получали физиологическую дозу витамина А (ежедневно 30 МЕ); группа IV (-А/+АА) – животные, до трансплантации находившиеся на рационе лишённом витамина А, а начиная с первого дня после трансплантации карциномы Герена получали сверхфизиологические дозы витамина А (ежедневно 3000 МЕ); группа V (-А/+лРК) – животные, до трансплантации находившиеся на диете, лишённой витамина А, а с первого дня после трансплантации карциномы Герена получали липосомальную форму полностью *транс*-ретиноевой кислоты (РК) в ежедневной дозе 10 мкг/кг; группа VI (-А/+носитель, опытный контроль I) – животные, до трансплантации находившиеся на диете, лишённой витамина А, а с первого дня после трансплантации карциномы Герена получали растительное масло; группа VII (-А/+РК, опытный контроль II) – животные, до трансплантации находившиеся на диете, лишённой витамина А, а с первого дня после трансплантации карциномы Герена получали РК (ежедневно 10 мкг/кг); группа VIII (-А/+л, опытный контроль III) – животные, до трансплантации находившиеся на рационе, лишённом витамина А, а начиная с первого дня после трансплантации карциномы Герена, получали пустые липосомы. Интенсивность роста карциномы Герена определяли по критериям величины опухоли и продолжительности жизни животных [16]. Витамин А вводили ежедневно *per os* в виде раствора ретинилацетата в растительном масле. Бислойные униламеллярные липосомы готовили из смеси спиртовых растворов фосфатидилхолина и холестерина по модифицированному методу замораживания-оттаивания с ультразвуковым диспергированием липида [17, 18], добавляя к подготовленной плёнке липидов РК, растворённую в 96% этиловом спирте (рис. 1). Степень захвата ретиноевой кислоты рассчитывали на основе доли, оставшейся в растворе РК после центрифугирования суспензии липосом [18].

Количество РК определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. И использованный метод позволял включить в липосомы 75–80% ретиноевой кислоты. РК в липосомной форме вводили *per os* через 24 часа, начиная с первого дня перевивки опухоли из расчета 10 мкг РК и 100 мг фосфолипида на 1 кг массы животного.

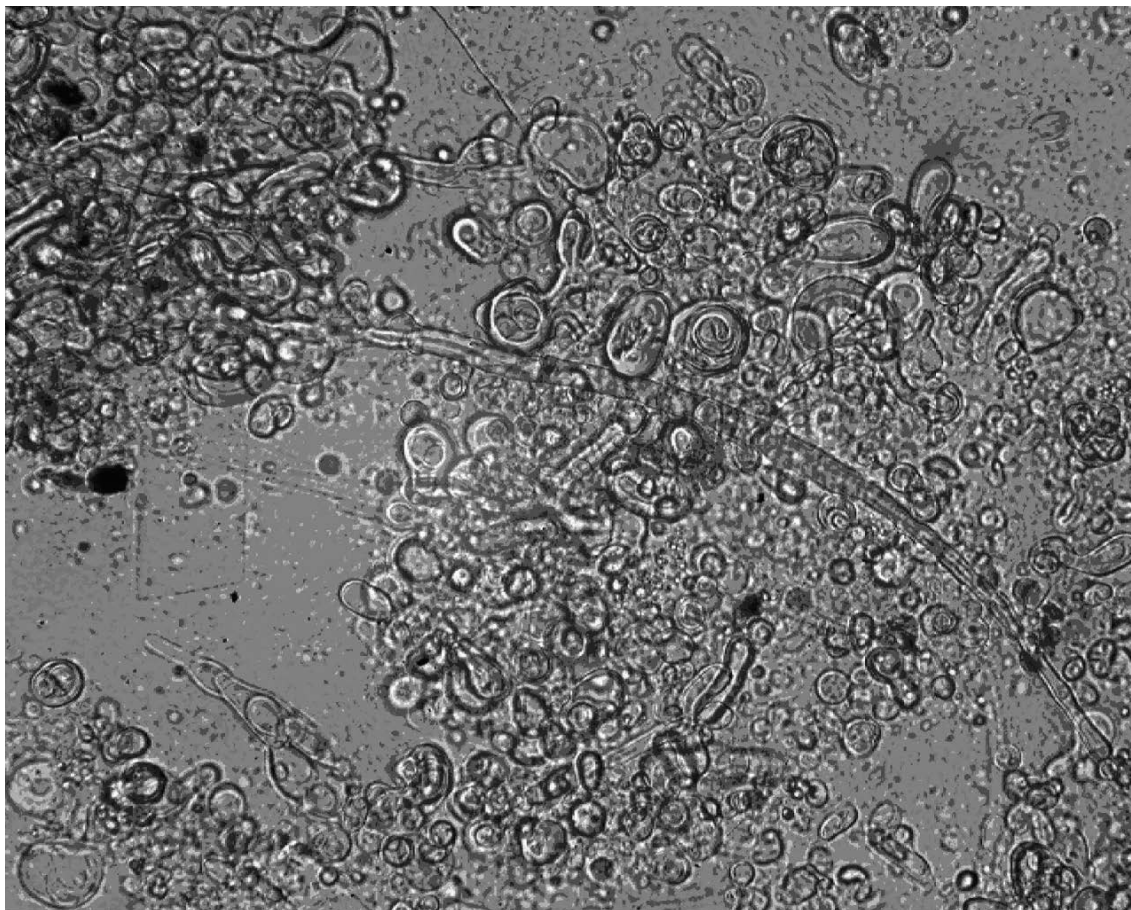


Рисунок 1.

Микрофотография липосомальной формы ретиноевой кислоты.

Эвтаназию животных проводили согласно международным принципам Европейской конвенции “О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей” (Страсбург, 1998) и норм биомедицинской этики, в соответствии с Законом Украины “О защите от жестокого поведения” (Киев, 2006).

Выделение микросомной фракции, анализ её чистоты и определение *n*-гидроксилазной и *N*-деметилазной активностей цитохрома P450 проводили по ранее описанному методу [17]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Восстановление витаминных А ресурсов авитаминозного организма с опухолью дозозависимо модулирует темпы роста опухоли. В отношении злокачественно трансформированных клеток в ряде работ показана противоопухолевая активность различных форм витамина А [4, 5], в то же время

существуют экспериментальные данные, указывающие на опухолестимулирующее влияние ретиноидов [6–8]. Это, в первую очередь, результаты исследований опухолестимулирующей активности предшественников витамина А – β-каротина – у лиц с раком лёгких [7]. Наряду с этим, результатами *in vitro* исследований клеточных популяций различных типов эпителия в условиях супрафизиологических концентраций витамина А показано снижение длительности латентного периода трансформации, повышения частоты возникновения и степени злокачественности трансформируемых клеток [8, 17]. Учитывая сложный механизм реализации ретиноидами своих биологических функций, включающий возможное взаимодействие более чем с 500 генами, которые могут быть мишенями ретиноидов, и различный уровень их экспрессии в различных типах клеток [14], однозначного ответа относительно молекулярных аспектов их влияния на опухолевый рост дать сегодня не удаётся. В наших исследованиях использована модель трансплантации трансформированных клеток *in vivo*, позволяющая исследовать особенности роста уже сформированных опухолей в организме, экспериментально отвечающая условиям роста диагностированных на начальных этапах злокачественных новообразований.

Учитывая ведущую роль ретиноидов в ключевых процессах клеточного метаболизма, мы предположили, что в условиях роста *in vivo* опухолевые клетки нуждаются в поступлении ретиноидов, основным эндогенным депо которых является печень [14], экскретирующая их (преимущественно в форме ретинола) в комплексе с ретинолсвязывающими белками [20]. Это может рассматриваться как метаболическое звено взаимодействия опухоли и организма, определяющее зависимость трансформируемых клеток от витаминных А ресурсов организма. Для проверки высказанного предположения нами был смоделирован авитаминоз у опытных животных, которым в дальнейшем трансплантировали опухолевые клетки. Проведённые исследования показали, что рост карциномы Герена в организме, лишённом витаминных А ресурсов, ингибируется, на что указывают показатели темпов роста опухоли (рис. 2), а также увеличение продолжительности жизни опытных животных (рис. 3). В частности, в логарифмическую стадию роста карциномы Герена величина морфологических параметров опухолей животных, лишенных витамина А, была в 2,3 раза меньше от показателей контрольной группы, достигая почти полной регрессии на терминальных этапах эксперимента (рис. 2). Установленное снижение темпов роста опухолевой ткани согласуется с данными работы [21], где показано, что отсутствие витамина А в диете сопровождается ростом интенсивности образования активных форм кислорода (АФК) в первичной опухолевой ткани и метастазирующих зачатках, накоплением продуктов окисления ДНК/РНК (8-гидрокси-2'-дезоксигуанин, 8-гидроксигуанин) и липидов (4-гидрокси-2-ноненаль), а также рост количества апоптотических клеток. В то же время введение в рацион физиологических доз витамина А обуславливало увеличение опухолевой массы в организме и отсутствие разницы в морфологических параметрах опухолей в период активного роста карциномы Герена в сравнении с контрольной группой (рис. 2). Введение супрафизиологических доз в организм опухоленосителя сопровождалось возрастанием темпов роста опухоли, размеры и вес которой в исследуемый период преобладали над показателями контрольной группы соответственно в 3,2 и 1,7 раза (рис. 2, рис. 4). В это же время, обнаруженная зависимость темпов роста карциномы Герена от обеспеченности витамином А носила дозозависимый характер ($r=0,83$), что указывало на индукционную (в отношении увеличения опухолевой массы) роль витамина А в авитаминозном организме с карциномой Герена (рис. 5). Анализируя математически полученную зависимость, можно предположить, что в логарифмический период роста карциномы Герена результатом увеличения количества витамина А в диете авитаминозных животных на каждые 100 МЕ является прирост опухолевой массы на 1 см³.

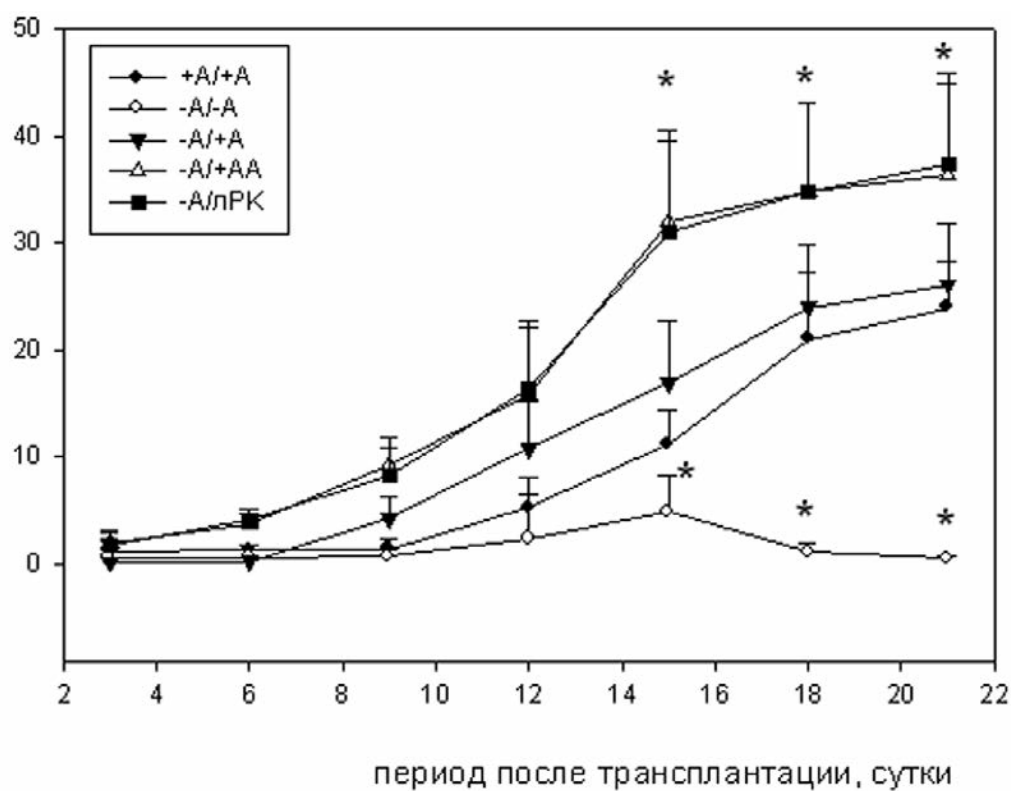


Рисунок 2.

Темпы роста карциномы Герена в условиях различной обеспеченности витамином А.

* - статистически достоверное различие в сравнении с контролем (+А/+А), $p < 0,05$.

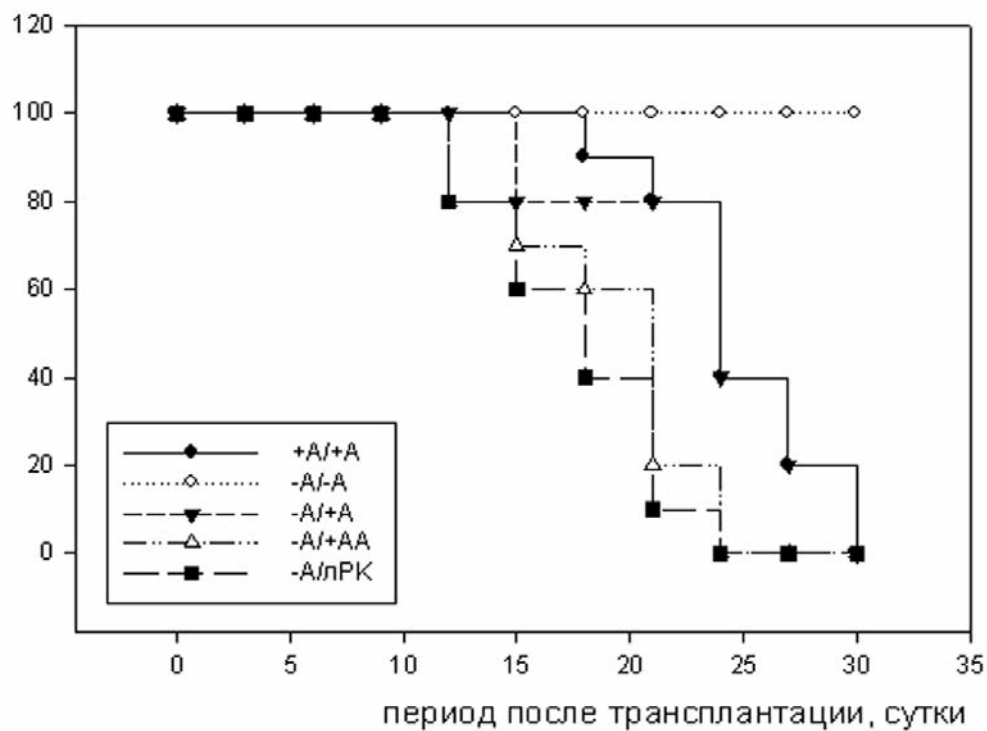


Рисунок 3.

Продолжительность жизни крыс с карциномой Герена в условиях различной обеспеченности витамином А.

* - статистически достоверное различие в сравнении с контролем (+А/+А), $p < 0,05$.

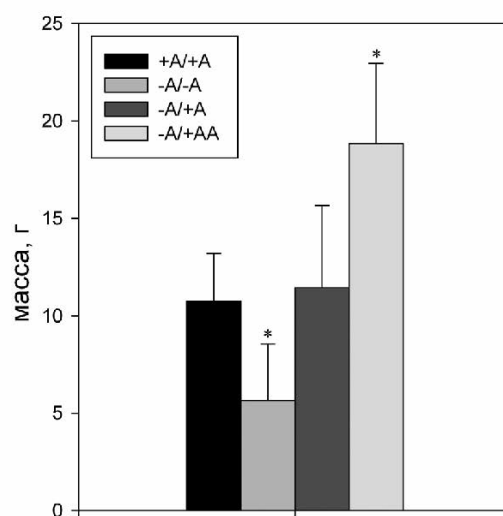
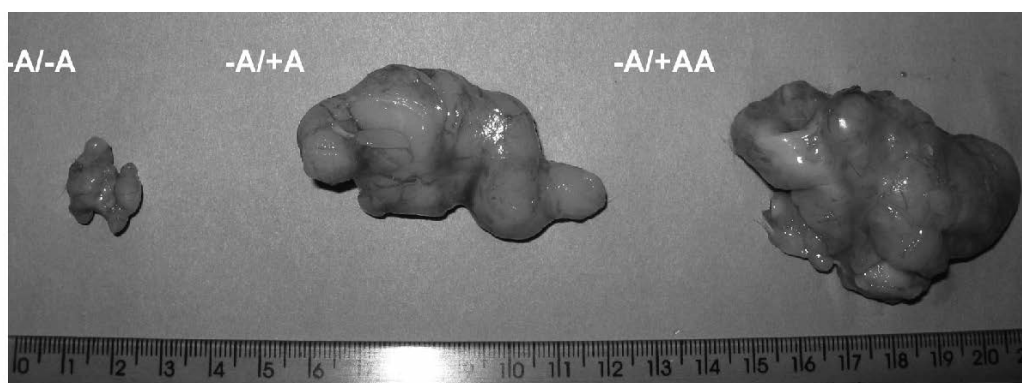


Рисунок 4.

Величина и масса карциномы Герена крыс с различной обеспеченностью витамином А в логарифмическую фазу опухолевого роста.

* - статистически достоверное различие в сравнении с контролем (+A/+A), $p < 0,05$.

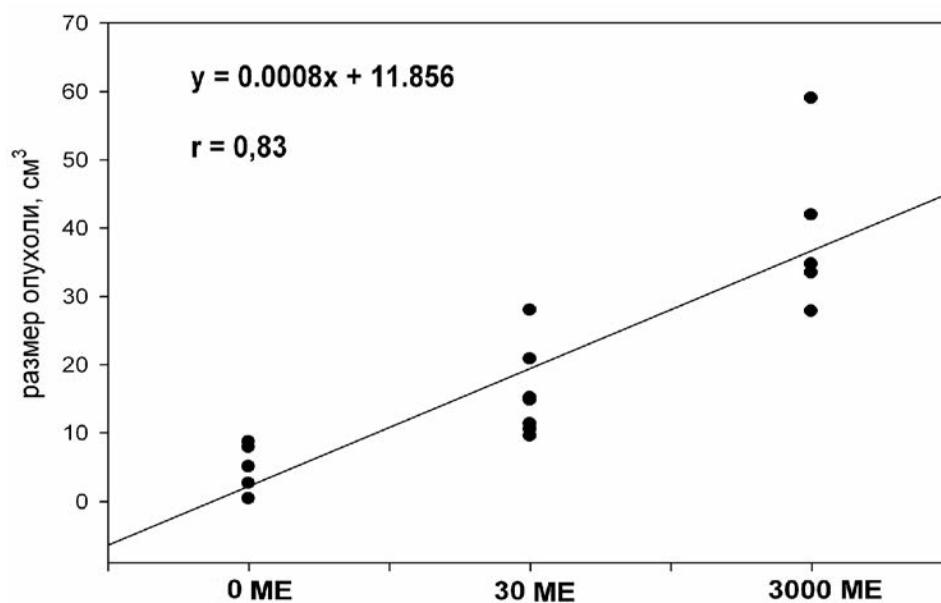


Рисунок 5.

Зависимость показателей размера карциномы Герена и количества витамина А в экспериментальной диете.

Морфологические параметры опухолевого роста положительно коррелируют с гидроксилазной и деметилазной активностями системы цитохрома P450 карциномы Герена. Опухолевый рост характеризуется высокой метаболической активностью опухолевых клеток и образованием значительного количества токсических продуктов метаболизма [9], требующего высокого уровня активности компонентов клеточной системы детоксикации [10]. Ведущим элементом этой системы является микросомальная монооксигеназная система, повышенный уровень активности которой объясняет феномен лекарственной резистентности опухолей, а активация экспрессии определенных изоформ семейств *CYP1A*, *CYP2C* и *CYP3A* ассоциируется с опухолевым фенотипом [9]. В то же время известно, что экспрессия цитохромов P450 может быть индуцирована различными соединениями [10–12], чаще всего выступающими или субстратами этих изоформ или продуктами реакций других ферментов. Эта индукция может происходить прямо через активацию промотора, содержащего RARE (retinoic acid responsive element) путем его взаимодействия с рецепторами (RAR – retinoic acid receptor, RXR – retinoid X receptor) в комплексе с ретиноевой кислотой, или же связанного с гетеродимерами в комплексе из RPAR (рецепторы пролифераторов пероксисом) [4, 14]. В связи с этим мы заинтересовались, связаны ли обнаруженные морфологические параметры роста карциномы Герена с активностью цитохрома P450. Для проверки высказанного предположения мы исследовали интенсивность двух основных типов реакций гидроксилирования и окисления как основных реакций, катализируемых системой цитохрома P450 [10]. Установлено, что в авитаминозном организме карцинома Герена, характеризующаяся низкими темпами роста, обладала сниженной гидроксилазной и деметилазной активностями соответственно в 8 и 2 раза в сравнении с показателями контрольной группы животных (рис. 6, 7). В то же время введение в рацион животных физиологических доз витамина А сопровождалось повышением исследуемых активностей до контрольного уровня, а показатели гидроксилазной активности статистически достоверно преобладали над показателями контрольной группы в 2,17 раза (рис. 6). Обнаруженная тенденция увеличения *n*-гидроксилазной активности цитохрома P450 наблюдалась и в случае введения сверхфизиологических доз витамина А. Наряду с этим показатели в обоих случаях были статистически достоверно выше показателей контрольных животных. Полученные результаты показывают, что более чувствительным показателем к изменениям обеспеченности витамином А оказались показатели *n*-гидроксилазной активности ($r=0,81$) в сравнении с N-деметилазной ($r=0,49$), о чем свидетельствует чрезвычайно низкая гидроксилазная активность микросомной фракции карциномы Герена при отсутствии витамина А и ее возрастание при появлении в рационе этого витамина. Этот факт можно связать с тем, что основным типом реакций при участии цитохромов, происходящим с ретиноидами в клетке, является именно их гидроксилирование [22], а значительная их часть – это цитохромы индуцируемые ретиноидами [10–12].

Ретиноевая кислота индуцирует активацию гидроксилазной и деметилазной активностей цитохрома P-450 микросомальной фракции карциномы Герена. С целью проверки предположения о специфической индукции ретиноидами активности цитохромов нами была использована модель специфической доставки ретиноидов к опухолевым тканям. Известно, что наивысшей метаболической активностью ретиноидов владеет полностью *транс*-РК, обуславливающая в конечном итоге биохимические функции витамина А путём активации специфических ядерных рецепторов (RAR, но не RXR). Ретиноидам отводят также роль антиоксидантов, что экспериментально описывается в литературе [14], однако данное свойство зависит от формы ретиноида. Нами была выбрана полностью *транс*-ретиноевая кислота в дозе мкг/кг, эквивалентной 30 МЕ активности витамина А и отвечающая физиологической дозе

ИНДУКЦИЯ ЦИТОХРОМА P450 КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

в полусинтетическом рационе. Наряду с этим такая форма витамина А не может проявлять антиоксидантные свойства и вызванные ею эффекты реализуются исключительно по молекулярно-генетическим механизмам [4, 14]. Нами была разработана форма ретиноевой кислоты, инкапсулированная в липосому (рис. 1.), компонентный состав которой обеспечивает направленную доставку инкапсулированных веществ к опухолевым клеткам карциномы Герена [17]. Использование липосомных форм РК (но не пустых липосом или свободной РК) вызывало интенсификацию роста карциномы Герена и индукцию её гидроксилазной и деметилазной активностей, подобную показателям авитаминозных животных, получавшим гипердозы витамина А (рис. 6, 7). Это свидетельствует, что обнаруженный эффект в эксперименте с модуляцией витаминных А диет обусловлен именно активностью ретиноевой кислоты как модулятора генной активности, чем как антиоксиданта. Вероятно, витамин А, поступающий в авитаминозный организм в сверхфизиологических дозах, транспортируемый после абсорбции в составе хиломикронов и неспецифично захваченный опухолевыми клетками, должен быть инактивирован для устранения возможных токсичных влияний на организм вообще и опухолевую ткань в частности [22]. Подвергаясь интенсивному окислению в микросомах опухолевой ткани, ретинол сам по себе (как субстрат), а также образованная форма ретиноевой кислоты (продукт реакции и субстрат), обеспечивают индукцию гидроксилазной и деметилазной активностей, что также показано в работах [9, 12]. В то же время повышенный уровень активностей цитохромов позволяет опухолевой ткани интенсивней инактивировать и другие эндо- и экзогенные субстраты [23, 24], модифицировать сигнальные молекулы, увеличивая их активность, что в конечном итоге и обуславливает прирост опухолевой массы карциномы Герена.

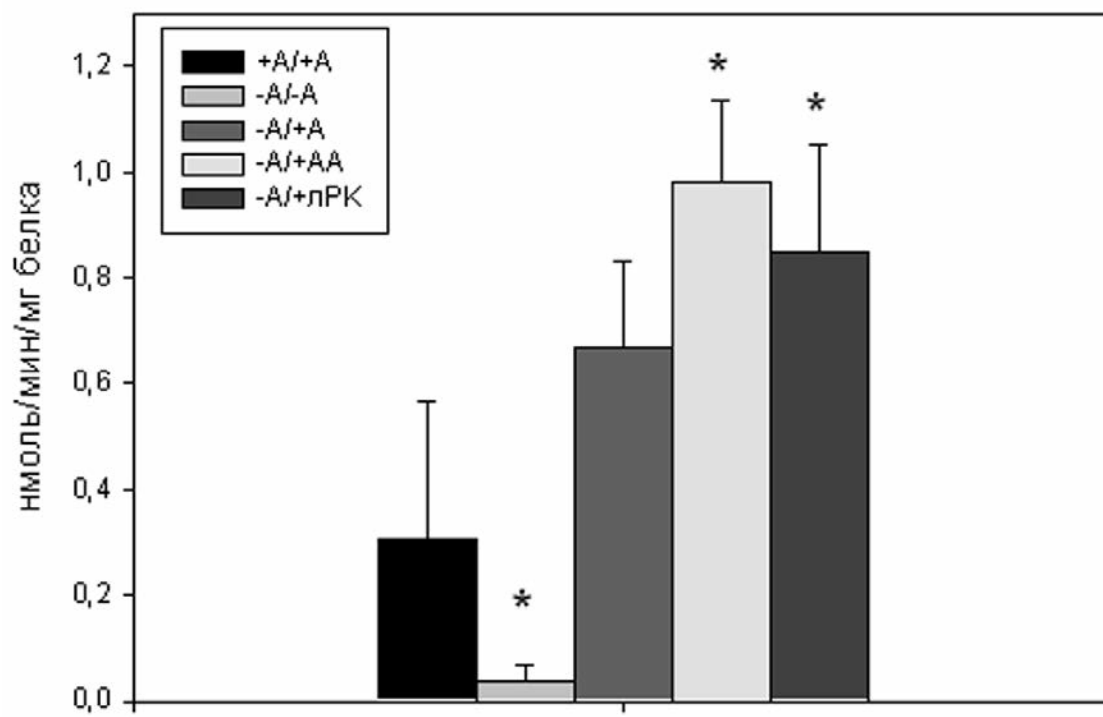


Рисунок 6.

n □ Гидроксилазная активность цитохрома P450 в микросомной фракции карциномы Герена.

* - статистически достоверное различие в сравнении с контролем (+A/+A), $p < 0,05$.

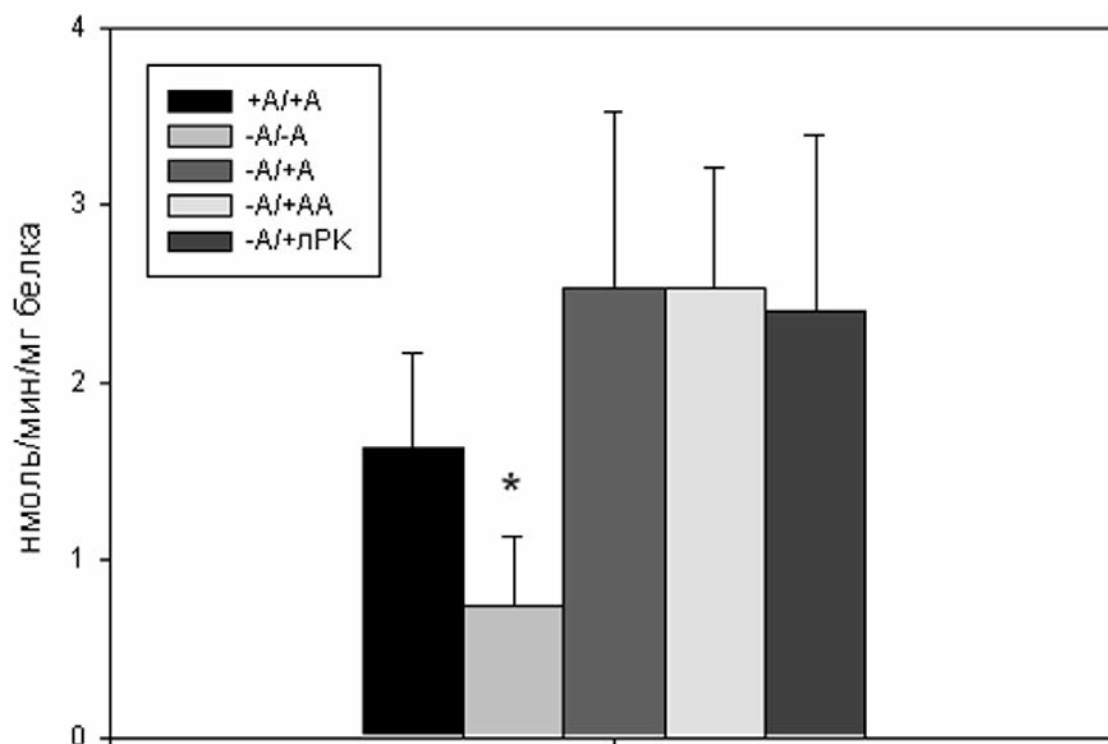


Рисунок 7.

□ Деметилазная активность цитохрома P450 в микросомной фракции карциномы Герена.

* - статистически достоверное различие в сравнении с контролем (+A/+A), $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, нами установлено, что восстановление витаминных А ресурсов авитаминозного организма с опухолью дозозависимо модулирует темпы роста карциномы Герена, что проявляется в ингибировании опухолевого роста в авитаминозном организме и его интенсификации при введении в рацион физиологических и супрафизиологических концентраций ретинилацетата, а также липосомной формы ретиноевой кислоты. Морфологические параметры опухолевого роста в условиях различной обеспеченности организма витамином А (0–3000 ME) положительно коррелируют с гидроксилазной ($r=0,81$) и деметилазной ($r=0,49$) активностями системы цитохрома P450 карциномы Герена. Увеличение темпов роста карциномы Герена наряду с активацией гидроксилазной активности цитохрома P450 микросомальной фракции злокачественного новообразования, наблюдаемое как при введении гипердоз ретинилацетата, так и селективной транспортной липосомальной формы полностью *транс*-ретиноевой кислоты, указывает на стимулирующий эффект ретиноидов в интенсификации опухолевого роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chambon P. (1996) FASEB J., **10**, 940-954.
2. Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J. (2001) Science, **294**, 1866-1870.
3. Balmer J.E., Blomhoff R. (2002) J. Lipid Res., **43**, 1773-1808.
4. Soprano K.J., Soprano D.R. (2002) J. Nutr., **132**, 3809S-3813S.

ИНДУКЦИЯ ЦИТОХРОМА P450 КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

5. *Tsimberidou A., Tirado-Gomez M., Andreeff M., O'Brien S., Kantarjian H., Keating M., Lopez-Berestein G., Estey E.* (2006) *Leukemia&Lymphoma*, **47**, 1062-1068.
6. *Gallicchio L.K.* (2008) *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 372-389.
7. *Crowe D., Kim R., Chandraratna R.* (2003) *Mol. Cancer Res.*, **1**, 532-540.
8. *Leo M.A., Lieber C.S.* (1999) *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 1071-1085.
9. *Oyama T., Kagawa N., Kunugita N., Kitagawa K., Ogawa M., Yamaguchi T., Suzuki R., Kinaga T., Yashima Y., Ozaki S., Isse T., Kim Y., Kim H., Kawamoto T.* (2004) *Front. Biosci.*, **9**, 1967-1976.
10. *Nebert D.W., Dalton T.P.* (2006) *Nature Reviews*, **6**, 947-960.
11. *Кобляков В.А.* (1998) *Биохимия*, **63**, 1043-1058.
12. *Murray M., Sefton R., Croft K., Butler A.* (2001) *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 1487-1497.
13. *Марченко М.М., Шмараков И.А., Пасайлюк М.В.* (2008) *Вопросы питания*, **77**, №6, 4-8.
14. *Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S.* (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, Raven Press, New York.
15. *Марченко М.М., Шмараков И.А., Пасайлюк М.В.* (2007) *Укр. биохим. ж.*, **79**(4), 127-135.
16. *Доненко Ф.Д., Мороз Л.В.* (1995) *Вестник РАМН*, **4**, 14-16.
17. *Марченко М.М., Копильчук Г.П., Кеца О.В., Шмараков И.А.* (2006) *Укр. биохим. ж.*, **78**, №4, 66-72.
18. *Будкер В.Г., Вахрушева Т.Е., Киселева Е.В., Христюкова Н.Б.* (1987) *Хим.-фарм. ж.*, №3, 347-352.
19. *Roos T., Jager F., Merk F., Bickers D.* (1998) *Pharmacol. Rev.*, **50**, 315-333.
20. *Ross C.A.* (2003) *J. Nutrition*, **133**, 291S-296S.
21. *Albright C., Salganik R., Dyke T.* (2004) *J. Nutrition*, **134**, 1139-1144.
22. *Bruno R., Njar V.* (2007) *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5047-5060.
23. *Roy B., Ogundigie P., Fujimoto N., Ito A.* (1991) *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 815-819.
24. *Peehl D., Feldman D.* (2003) *Endocrine-Related Cancer*, **10**, 131-140.

Поступила: 20. 10. 2010.

THE INDUCTION OF GUERIN'S CARCINOMA CYTOCHROME P450 HYDROXYLASE ACTIVITY BY RETINOIDS

I.A. Shmarakov, N.V. Katan

Department of Biochemistry and Biotechnology, Chernivtsi National University, Kotsyubynskyi ul., 2.,
Chernivtsi, 58000 Ukraine; e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

The interconnection of tumor growth process and the provision of the body with vitamin A was studied. The replenishment of vitamin A stores of vitamin-deficient tumor bearing animals modulated Guerin's carcinoma growth rate in a dose dependent manner ($r=0,83$). The morphological parameters of tumor growth at different provision with vitamin A positively correlated with hydroxylase ($r=0,81$) and demethylase ($r=0,49$) activities of the Guerin's carcinoma cytochrome P450 system. The induction of hydroxylase and demethylase activities of cytochrome P450 in Guerin's carcinoma microsomal fraction, observed either under conditions of overdose supplementation, or selective liposomal form of all-trans-retinoic acid, suggests the stimulatory effect of retinoids on tumor growth.

Key words: retinoids, cytochrome P-450, Guerin's carcinoma.