

ВПЛИВ АЛІМЕНТАРНИХ РЕТИНОЇДІВ НА РІСТ КАРЦИНОМИ ЛЬЮЇС У МИШЕЙ

І.О. ШМАРАКОВ, В.А. ДИМАШОК, Г.П. КОПИЛЬЧУК, М.М. МАРЧЕНКО

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

Ретиноїди (метаболіти й аналоги вітаміну А) – есенціальні сполуки, залучені в регуляцію процесів проліферації, диференціації, апоптозу та використовуються як багатообіцяючі речовини у лікуванні багатьох пухлин. Результати застосування ретиноїдів та їх попередників як протипухлинних засобів не завжди позитивні і досить часто свідчать про підвищення частоти виникнення пухлин та зростання летальності. З огляду на це, особливо застереження та обґрунтування потребує застосування фармакологічних доз вітаміну А з метою попередження та корекції росту злоякісних новоутворень. На моделі карциноми Льюїс показано, що введення у раціон фармакологічних доз вітаміну А викликає гальмування росту первинної пухлини за розмірами та за масою, що складає 10 % і 27 % при аліментарному надходженні 300 і 3000 міжнародних одиниць відповідно, проте супроводжується зниженням тривалості життя та збільшенням частоти метастазування тварин-носіїв карциноми. Рівень виживання мишей в період активного росту пухлини складав 80 % при введенні 300 МО та лише 40 % при застосуванні 3000 МО. Подібна концентраційна залежність спостерігалась у показниках частоти метастазування, рівень якої в період активного росту пухлини досягав 50 і 100 %, в той час як у групі тварин з фізіологічними дозами вітаміну А складав лише 33 %. Результати проведених досліджень показали, що аліментарне застосування фармакологічних доз вітаміну А з метою корекції росту карциноми Льюїс не володіє протипухлинною активністю і здатне посилювати онкогенез.

Ключові слова: ретиноїди, карцинома Льюїс, пухлинна кахексія.

Вступ. Ретиноїди (метаболіти й аналоги вітаміну А) – есенціальні сполуки, залучені в регуляцію ключових клітинних процесів проліферації, диференціації, апоптозу (Balmer & Blomhoff, 2002), та характеризуються різноманітною структурою, фармакологічним профілем, рецепторною афінністю, біологічною активністю та специфічною токсичністю (Lippman & Lotan, 2000). Здатність ретиноїдів індукувати диференціацію клітин та їх проапоптична активність дозволили розглядати цей клас сполук, як потенційні природні хіміотерапевтичні засоби (Dragnev et al., 2000, Lippman & Lotan, 2000). Численні експерименти, проведені з використанням тваринних моделей, клітинних культур, а також епідеміологічні дані та клінічні випробування забезпечили суттєве підґрунтя щодо використання ретиноїдів у попередженні і терапії раку (Bartolini et al., 2004; Dragnev et al., 2000; Chen et al., 2000; McCue et al., 1998). Додатковий взаємозв'язок між рівнем вітаміну А та частотою виникнення неоплазій виявлений на основі епідеміологічних даних, які показують обернену залежність між рівнем вітаміну А та частотою виникнення визначених злоякісних новоутворень (Dragnev et al., 2000). Додаткової впевненості у застосуванні хіміотерапевтичного підходу з використанням ретиноїдів додають результати успішної клінічної корекції ретиноїдами передракових уражень,

таких як оральна лейкоплакія, дисплазія шийки матки і пігментна ксеродерма (Dragnev et al., 2000). Клінічні випробування показують, що ретиноїди здатні перешкоджати повторній появі первинних пухлин, зокрема 13-цис-ретиноева кислота знижує частоту виникнення первинних пухлин травного тракту у хворих після резекції пухлин голови і шиї. Повторна поява первинних пухлин легенів зменшується при застосуванні ретиніл пальмітату при лікуванні хворих після резекції раку легенів I-ої стадії. Ациклічний ретиноїд, поліпреноева кислота, інгібує появу вторинних гепатоцелюлярних карцином після резекції або абляції первинного раку печінки (Dragnev et al., 2000). Однак позитивні результати, досягнуті при застосуванні ретиноїдів в корекції передракових станів та в інгібуванні промієлоцитарної лейкемії, експериментально не вдалося відтворити щодо інших злоякісних новоутворень. Крім того у випадках злоякісних новоутворень легенів та печінки застосування ретиноїдів та їх попередників як протипухлинних засобів призводило до підвищення частоти виникнення пухлин та зростання летальності (Leo & Lieber, 1999; Omenn et al., 1996). З огляду на це, особливо застереження та обґрунтування потребує застосування фармакологічних доз вітаміну А з метою попередження та корекції росту злоякісних новоутворень. Мета роботи – встано-

вити вплив аліментарних ретиноїдів на процеси росту карциноми Льюїс.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на мишах лінії C57 BL6/J віком 3 місяці. Всі тварини впродовж експерименту одержували напівсинтетичний раціон, збалансований за всіма нутрієнтами (Reeves et al., 1993). Вода і їжа були доступні *ad libitum*, рівень споживання яких фіксувався двічі на добу. Як модель злоякісного новоутворення використовували карциному Льюїс (штам пухлини люб'язно наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України), трансплантацію якої здійснювали шляхом внутрішньом'язевого введення 0,2 мл 10 % суспензії клітин у фізіологічному розчині ($3 \cdot 10^6$ кл/мл). Починаючи з 5 доби після інюкуляції пухлинних клітин, тварини були розділені на групи, які отримували щоденно інтрагастрально *per os* фізіологічну (30 МО) і фармакологічні (300 МО та 3000 МО) дози вітаміну А у вигляді ретиніл ацетату. Щоденно проводився моніторинг морфологічних параметрів дослідних тварин (маса тіла, розмір основного пухлинного вузла). Евтаназію тварин проводили на 18 добу після перещеплення карциноми Льюїс (період активного росту пухлини та початок гематогенного метастазування у легені) під легким ефірним наркозом та згідно міжнародних принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) та норм біомедичної етики, відповідно до Закону України «Про захист від жорстокого поводження» (Київ, 2006). За добу до проведення евтаназії у тварин збирали сечу для визначення рівня екскреції азоту сечовини, розраховували азотний баланс та виражали як різницю спожитого та виведеного азоту.

Для досліджень використовували кров, печінку, легені та первинну пухлину. Частоту метастазування пухлини розраховували у відсотках (по відношенню числа тварин з метастазами до загальної кількості тварин у групі). Сироватку отримували шляхом центрифугування зразків крові при 1500 g протягом 15 хв. Визначення рівня сечовини, глюкози, триацилгліцеролів проводили з використанням стандартних наборів НПП «Фелісіт-діагностика» (Дніпропетровськ). Визначення рівня кетонових тіл проводили колориметрично за методом Натальсона (Горячківський, 2005). Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Різниці вважалися достовірними при $P < 0,05$.

Результати та обговорення. Результати проведених досліджень показали, що аліментарне застосування фізіологічних доз вітаміну А (30 МО)

не впливало на процеси росту карциноми Льюїс у мишей. Водночас введення у раціон фармакологічних доз вітаміну А викликало гальмування росту первинної пухлини (як за розмірами, так і за масою), яке складало 10 % і 27 % при аліментарному надходженні 300 і 3000 міжнародних одиниць відповідно (Рис. 1 А, Б).

In vitro хіміопротективна активність ретиноїдів щодо пухлинних клітин пов'язана передусім з тригеруванням арешту клітинного циклу в G_1 періоді з наступною супресією клітинного росту та зниженням експресії білків-циклінів G_1 періоду (Zhang et al., 2001). Вказаний ретиноїд-індукований арешт в G_1 періоді відбувається посттрансляційно, а репресія ретиноїдами експресії циклінів блокується інгібіторами протеасомного протеолізу, що свідчить про активацію механізмів, залежних від протеасоми, при попередженні клітинної трансформації ретиноїдами. Молекулярною мішенню негативної модуляції клітинного циклу слід також розглядати продукт гена *p21*, експресія якого знаходиться під контролем ретиноїдів внаслідок присутності у промоторі респонсивних елементів ретиноевих кислот (Tanaka et al., 2007). Біологічний зміст такої затримки у G_1 періоді, сигналізованої обробкою ретиноїдами, полягає передусім у репарації мутагенних пошкоджень геномної ДНК канцерогенами або повній елімінації трансформованої клітини (Dragnev et al., 2000).

Водночас дослідження *in vivo* нашоухуються на проблему створення локальної ефективної концентрації ретиноїдів у мікрооточенні пухлинних клітин. Результати наших досліджень показують, що хоча зі зростанням аліментарно введеної дози ретиноїдів знижуються темпи росту первинної пухлини, проте повного інгібування пухлинного росту не відбувається (Рис. 1 А). Позитивна на перший погляд динаміка щодо протипухлинної активності аліментарно застосованих ретиноїдів виявляється несуттєвою з огляду на зниження тривалості життя та збільшення частоти метастазування тварин-носіїв карциноми. Рівень виживання мишей в період активного росту пухлини складав 80 % при введенні 300 МО та лише 40 % при застосуванні 3000 МО (Рис. 1 В). Отримані результати узгоджуються з описаними у науковій літературі фактами, коли вітамін А та його метаболічні форми використовуються як багатообіцяючі речовини у лікуванні багатьох пухлин, але дози необхідні для успішного лікування зазвичай токсичні і призводять до розвитку «синдрому гіпервітамінозу А» (Patatanian & Thompson, 2008). Крім того у пухлиноносіїв часто розвивається резистентність до цих терапевтичних засобів (Frankel et al., 1992.).

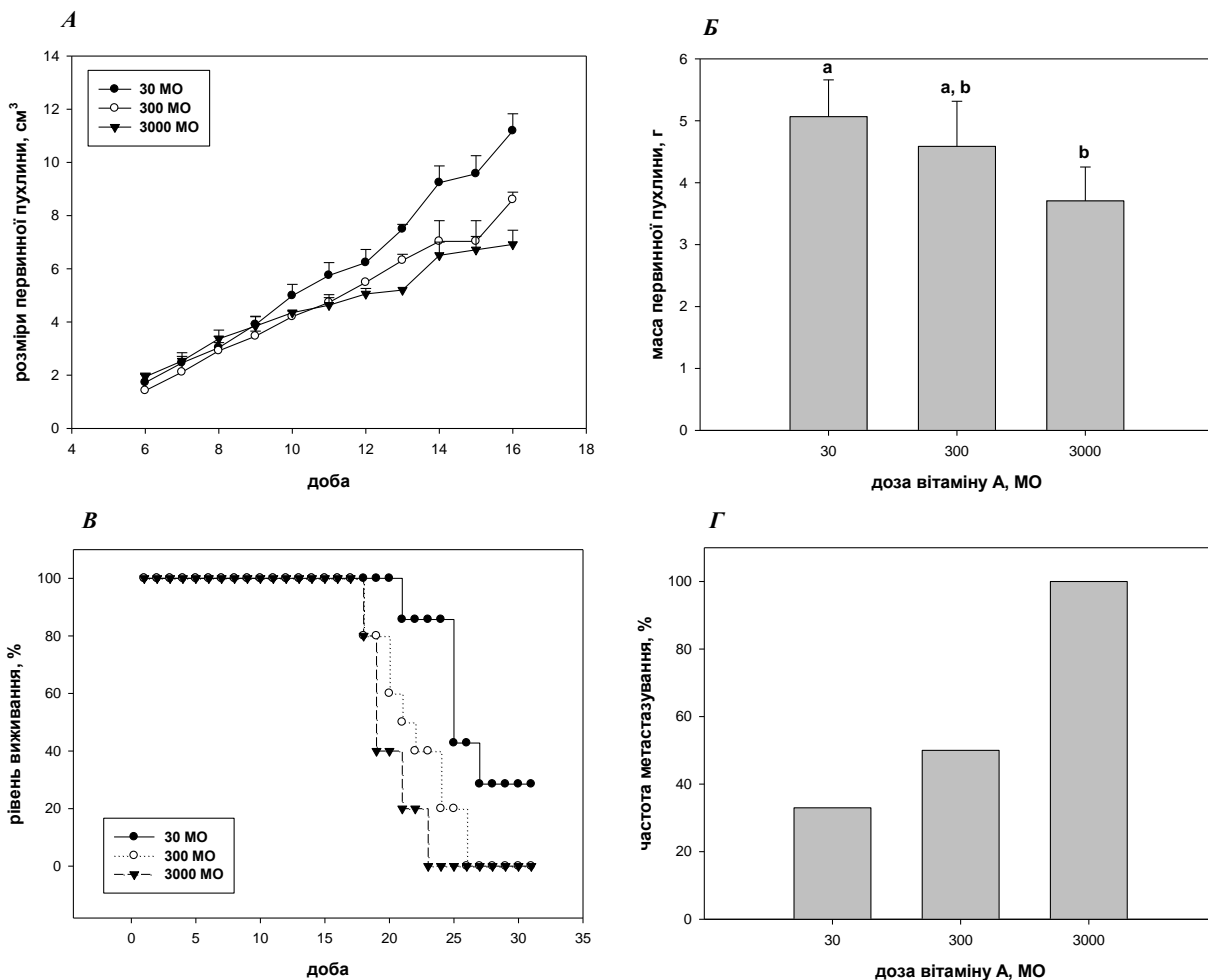


Рис.1. Морфологічні показники росту карциноми Льюїс при аліментарному застосуванні ретиноїдів. Примітка: А – розміри первинної пухлини (см³) у різні експериментальні періоди; Б – маса первинної пухлини (г) на 18 добу експерименту; В – рівень виживання (%) дослідних тварин; Г – частота метастазування (%) у легені на 18 добу експерименту; величини, позначені різними літерними індексами (a, b) статистично відрізняються, $P < 0,05$.

Fig. 1. Morphological indicators of Lewis carcinoma growth under alimentary retinoids usage. Note: A – primary tumor size (cm³) at different experimental periods, B – primary tumor mass (g) on day 18 of the experiment, C – survival rate (days) of experimental animals, D – frequency metastasis (%) in lung at day 18 of the experiment; values with different indices (a, b) statistically different, $P < 0,05$.

Подібна концентраційна залежність спостерігалась у показниках частоти метастазування, рівень якої в період активного росту пухлини досягав 50 і 100 %, в той час як у групі тварин з фізіологічними дозами вітаміну А складав лише 33 % (Рис 1 Г.). Очевидно, що в організмі пухлиноносія при застосуванні фармакологічних доз вітаміну А посилювався онкогенез карциноми. Проте з огляду на показники гальмування росту первинної пухлини, виявлене посилення було зумовлено не стільки посиленням агресивності пухлинних клітин, скільки послабленням протипухлинного захисту організму пухлиноносія. Метаболічні шляхи організму повинні були спрямовуватися не лише на подолання енергетичної недостатності, викликаной ростом пухлини та розвитком кахексії (Donohoe et al., 2011), але й дола-

ти наслідки токсичності надвисоких доз вітаміну А (Patatanian & Thompson, 2008). Підтвердженням висловленого можна розглядати посилення пухлинної кахексії при щоденному введенні 3000 МО вітаміну А в організм з карциномою Льюїс. У тварин вказаної групи фіксувалось статистично достовірне зниження рівня глюкози сироватки крові, гіпертриацилгліцеролемія та посилення негативного азотного балансу (Рис. 2). Пухлинні клітини активно споживають азот і глюкозу, що внаслідок обмеженості запасів глюкози в організмі зумовлює активізацію процесів, спрямованих на вивільнення доступних енергетичних субстратів. Підвищення утилізації глюкози на фоні інсулінорезистентності та зниженої толерантності до глюкози призводить до посилення ліполізу та вищнаження жирових депо (Tisdale, 2002).

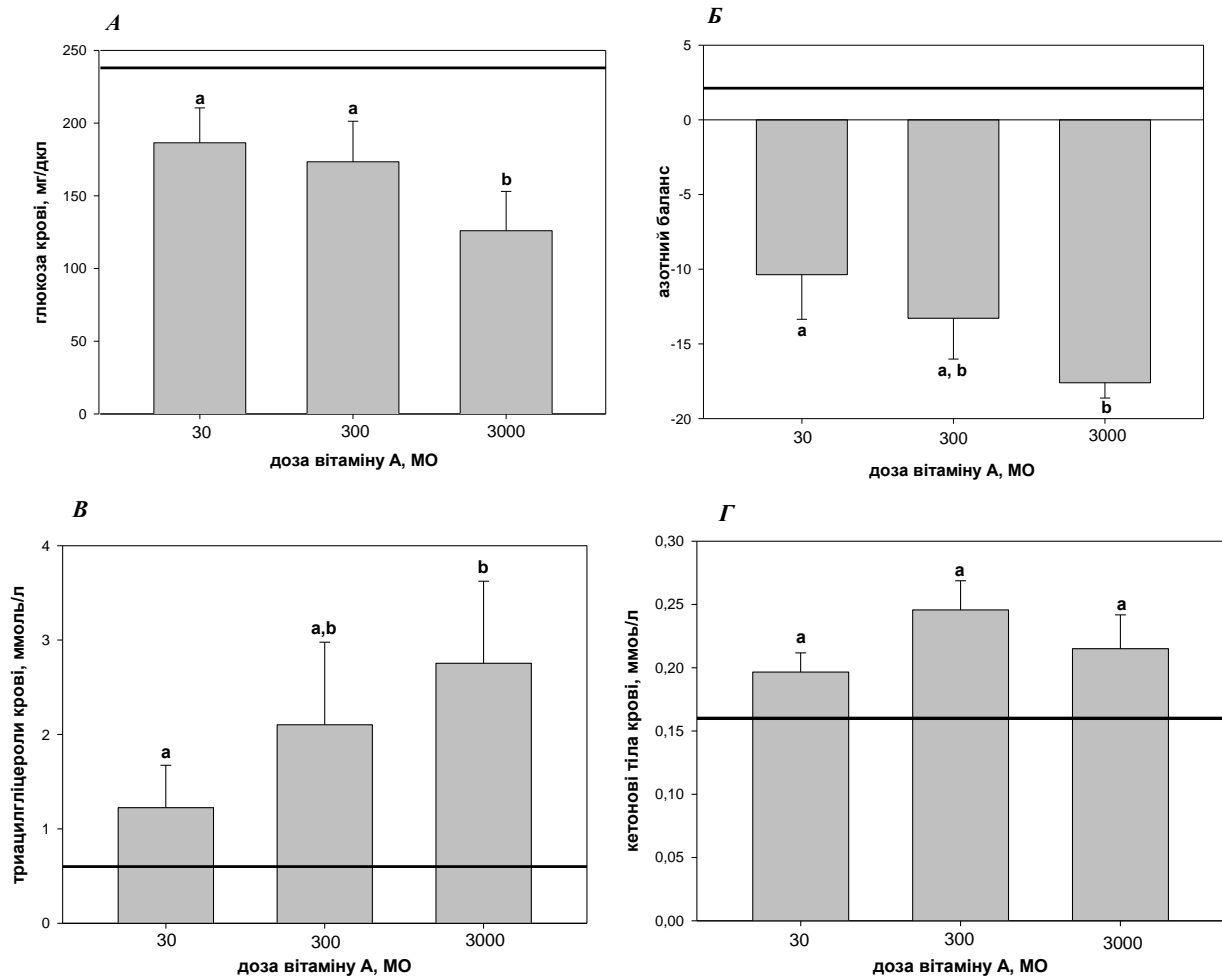


Рис.2. Біохімічні параметри пухлинної кахексії у тварин з карциномою Льюїс при аліментарному застосуванні ретиноїдів

Примітка: А – рівень глюкози у сироватці крові (мг/дкл); Б – азотний баланс, визначений як різниця спожитого та виведеного азоту; В – рівень триацилгліцеролів у сироватці крові (ммоль/л); Г – рівень кетонових тіл у сироватці крові (ммоль/л); величини, позначені різними літерними індексами статистично відрізняються, $P < 0,05$.

Fig. 2. Biochemical parameters of tumor cachexia in animals with Lewis carcinoma under alimentary retinoids usage.

Note: A – blood glucose level (mg/dl), B – nitrogen balance, defined as the difference between consumed and derived nitrogen; C – serum triglyceride level (mmol/l); D – serum ketone bodies level (mmol/l); values with different indices (a, b) statistically different, $P < 0,05$

Отже, результати проведених досліджень показали, що аліментарне застосування фармакологічних доз вітаміну А з метою корекції росту карциноми Льюїс не володіє протипухлинною активністю і здатне посилювати онкогенез.

Список літератури:

1. Горячковський О.М. Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. – Одеса: Екологія, 2005. – 616 с.
2. Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial // J. Natl. Cancer Inst. – 1996. – Vol. 88, N 21. – P. 1550 – 1559.
3. Balmer J. E. and R. Blomhoff Gene expression regulation by retinoic acid // J. Lipid Res. – 2002. – Vol. 43. – P. 1773 – 1808.
4. Dragnev K. H., Rigas J. R., Dmitrovsky E. The

Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms // The Oncologist. – 2000. – Vol. 5. – P. 361 – 368.

5. Reeves P., Nielsen F., Fahey G. J. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet // J. Nutr. – 1993. – Vol. 123. – P. 1939 – 1951.
6. Lippman S., Lotan R. Advances in the Development of Retinoids as Chemopreventive Agents // J. Nutr. 2000 – Vol. 130. – P. 479S – 482S.
7. McCue P. A., Thomas R. S., Schroeder D., Gubler M. L., Sherman M. I. Effects of Dietary Retinoids upon Growth and Differentiation of Tumors Derived from Several Murine Embryonal Carcinoma Cell Lines // Cancer Res. – 1988. – Vol. 48. – P. 3772 – 3779.
8. Frankel S. R., Eardley A., Lauwers G., Weiss M., Warrell R. P. The retinoic acid syndrome in acute

- promyelocytic leukemia // *Ann. Intern. Med.* – 1992. – Vol. 117. – P. 292 – 296.
9. Bartolini G., Ammar K., Mantovani B., Scanabissi F., Ferreri A. M., Rocchi P., Orlandi M. Retinoids and Cancer: Antitumor Effect of ATRA and of a New Derivative of Retinoic Acid, IIF, on Colon Carcinoma Cell Lines CaCo-2 and HT-29 // *Anticancer Res.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1779 – 1784.
 10. Zhang D., Vuocolo S., Masciullo V., Sava T., Giordano A., Soprano D., Soprano K. Cell cycle genes as targets of retinoid induced ovarian tumor cell growth suppression // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 7935 – 7944.
 11. Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Enriquez S., Marin-Hernandez A., Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells // *FEBS J.* – 2007. – Vol. 274. – P. 1393 – 1418.
 12. Leo M. A., Lieber C. S. Alcohol, vitamin A, and β -carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 69. – P. 1071 – 1085.
 13. Tanaka T., Suh K., Lo A. M., De Luca L. M. p21^{WAF1/CIP1} Is a Common Transcriptional Target of Retinoid Receptors // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – № 41. – P. 29987 – 29997.
 14. Patatanian E., Thompson D. Retinoic acid syndrome: a review // *J. Clin. Pharm. Therap.* – 2008. – Vol. 33. – P. 331 – 338.
 15. Chen Y., Wu Q., Chen Zh., Chen F., Su W. Effects of all-trans retinoic acid on growth of xenograft tumor and its metastasis in nude mice // *Chinese Med. J.* – 2000. – Vol. 115, № 4. – P. 345 – 349.
 16. Donohoe C. L., Ryan A.M., Reynolds J. V. Cancer Cachexia: Mechanisms and Clinical Implications // *Gastroenterology Res. Pract.* – 2011. – Vol. 11. – P. 1 – 13.
 17. Tisdale M. J. Biology of Cachexia // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2. – P. 862 – 871.

NUTRITIONAL RETINOID INFLUENCE ON LEWIS LUNG CARCINOMA GROWTH IN MICE

I. O. Shmarakov, V. A. Dymashok, G. P. Kopylchuk, M. M. Marchenko

Retinoids (vitamin A metabolites and analogues) - essential compounds involved in the regulation of proliferation, differentiation, apoptosis and are used as promising agents in the treatment of many tumors. The results of retinoid and their precursors use as anticancer compounds are not always positive and often show an increase in the tumor incidence and mortality. For this reason, special precautions and rationale are required the use of pharmacological doses of vitamin A for the prevention and correction of malignant tumors growth. Using the model of Lewis carcinoma it is shown that dietary pharmacological doses of vitamin A causes inhibition of size and mass of the primary tumor, accounting for 10% and 27% under alimentary administration of 300 IU and 3000 respectively, but cause a decrease in the survival rate and increased metastasis incidence in the animals. Survival rates of mice during active tumor growth was 80% when administered 300 IU, and only 40% with 3000 IU. This concentration dependence was observed in terms of the frequency of metastasis rate, which in the period of active growth of the tumor reached 50 and 100%, while in the group of animals with physiological doses of vitamin A is only 33%. The studies showed that the alimentary use of pharmacological doses of vitamin A in order to correct the growth of carcinoma Lewis does not have antitumor activity and can enhance oncogenesis.

Key words: retinoids, Lewis carcinoma, tumor cachexia.

Одержано редколлегією 25.03.2013