

А.П. Бурлака¹
І.М. Мотузюк²
О.І. Сидорчук²
С.В. Вірко³

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця МОЗ України

³Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак молочної залози, пухлина, мамарна жирова тканина, цитохром P450, CYP 1A2, CYP 19A1, ожиріння.

АКТИВНІСТЬ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОХРОМУ P450 У ПУХЛИНАХ ТА МАМАРНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Цитохром P450 (CYP) становить оксигеназу, залучену в біосинтез і метаболізм естрогенів та у відповідь пухлини на антиестрогенну терапію, тому визначення ролі CYP в етіопатогенезі раку молочної залози (РМЗ) надає важливу інформацію і для розуміння механізму чутливості пухлини до лікування. **Мета:** дослідити рівні цитохрому P450 (у окисненому і низькостіновому станах) та ізоформ CYP 1A2, CYP 19A1 у тканині пухлин молочної залози (МЗ) та мамарній жировій тканині (МЖТ) хворих на РМЗ. **Об'єкт і методи:** в дослідженні використані 58 зразків пухлинної тканини та мамарної жирової тканини (5 см від пухлинного вузла) хворих на РМЗ II–III стадії (37 і 21 пацієнтка відповідно) з різним індексом маси тіла (ІМТ) — ≤ 25 і ≥ 25 кг/м². Рівні окисненого та низькостінового цитохрому P450 та його ізоформи CYP 19A1 досліджували методом електронно-парамагнітного резонансу та спектрофотометрично. Імуноблотинг проводили відповідно до стандартних протоколів з антитілами проти CYP 1A2, CYP 19A1, GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). **Результати:** виявлено високі рівні цитохрому P450 (ізоформи CYP 19A1 і CYP 1A2) у тканині РМЗ II і III стадії та прилеглий МЖТ. Встановлено, що при утворенні комплексу P450 (CYP 19A1) з андростендіоном у МЖТ хворих на РМЗ виявляються інтенсивні сигнали ЕПР з g-факторами 8,1 і 3,28, які можуть бути маркером метаболічної активності ферменту. Накопичення жирової тканини змінює активність цитохрому P450, особливо його низькостінової форми; зростання рівнів окисненої (g = 2,42) і низькостінової (g = 2,25) форм ферменту, що корелює з підвищенням ІМТ (≥ 25 кг/м²). Встановлено також зростання рівнів CYP 1A2 у тканині та МЖТ, що свідчить про можливий вплив CYP 1A2 на енергетичний метаболізм клітин РМЗ. **Висновки:** виявлені високі рівні цитохрому P450 у пухлинах та МЖТ хворих на РМЗ, що обґрунтовує його потенційне застосування як біомаркера при прийнятті рішень щодо персоналізованих схем гормональної терапії. Підвищення активності ізоформ P450 (CYP 1A2 і CYP 19A1) у МЖТ може бути фактором ризику прогресування РМЗ, особливо за наявності ожиріння та з підвищенням тривалості впливу естрогенів.

Цитохроми P450 (CYP) є класом гемвмісних ферментів, які синтезуються в печінці, нирках, легенях, мозку, шлунково-кишковому тракті, молочних залозах (МЗ). CYP індуються при розвитку ряду патологічних станів, зокрема раку, ожиріння і діабету II типу, що свідчить про залучення цього ферменту до низки біологічних процесів. У МЗ цитохром P450, крім цього, відіграє важливу роль, надаючи клітинам здатність метаболізувати гормони та екологічні канцерогени [1–3]. Ризик розвитку раку молочної залози (РМЗ) може визначатися генетичними, метаболічними факторами та особливостями способу життя, які можуть впливати на метаболізм статевих гормонів. Цитохром P450 становить оксигеназу, залучену в біосинтез і метаболізм естрогенів

у відповідь на антиестрогенну терапію, тому визначення його ролі в етіопатогенезі РМЗ може забезпечити важливу інформацію для розуміння механізму чутливості пухлини до лікування. Все викладене зумовлює актуальність дослідження активності цитохрому P450 у клітинах тканин (зокрема тканині МЗ) та його вплив на рівні супероксидних радикалів (СР), які генеруються ферментом і статевими гормонами.

Цитохроми P450 каталізують монооксигенацію широкого кола органічних молекул, включаючи стероїдний біогенез, метаболізм лікарських засобів, активацію проканцерогенів, детоксикацію ксенобіотиків і обмін жирних кислот. Перенесення електрона від окисно-відновного партнера цитохромом P450 на субстрат є ключовим етапом у каталітичному циклі

цих білків. Мітохондріальний цитохром P450 отримує електрони від FeS-білка феродокину, тоді як окисно-відновним партнером для мікосомального цитохрому P450 є ФАД/ФМН-вмісна НАДФ • Н-цитохром P450 оксидоредуктаза. Проблема механізму переносу електронів є одним із важливих аспектів досліджень. Суперсімейство цитохрому CYP ділиться на родини та підродини на основі амінокислотного складу. У ссавців описано 14 родин, які можуть бути функціонально поділені на ті, що беруть участь у синтезі стероїдів, жовчних кислот і ω -гідроксидування жирних кислот, і ті, які полегшують виведення ксенобіотиків і стероїдів з організму [4–7]. Основні ізоформи цитохрому P450 та їх характеристики у клітинах людини наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика ізоформ цитохрому P450

Родини	Підродини	Ізоформи цитохрому	Реакції, які вони реалізують
1	1A	CYP 1A1, CYP 1A2	Метаболізм ксенобіотиків і стероїдів
1	1B	CYP 1B1	Метаболізм ксенобіотиків і стероїдів
2	2A	CYP 2A6	Метаболізм ксенобіотиків
2	2B	CYP 2B6	Метаболізм ксенобіотиків і стероїдів
2	2C	CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C18, CYP 2C19	Метаболізм ксенобіотиків
2	2D	CYP 2D6	Метаболізм ксенобіотиків
2	2E	CYP 2E1	Метаболізм ксенобіотиків
3	3A	CYP 3A4, CYP 3A5, CYP 3A7	Метаболізм ксенобіотиків і стероїдів
4	4A	CYP 4A11	ω -Гідроксилювання жирних кислот
19		CYP 19A1	Ароматаза (синтез естрогенів)

Тому метою дослідження стало вивчення рівнів цитохрому P450 (у окисненому, низькоспіновому стані) та його ізоформ CYP 1A2, CYP 19A1 у тканині пухлин МЗ та мамарній жировій тканині (МЖТ) хворих на РМЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження було залучено 58 хворих (середній вік — $48,2 \pm 10,2$ року) на РМЗ II, III стадії (37 і 21 відповідно), які перебували на лікуванні в Національному інституті раку. У всіх випадках діагноз верифікований гістологічно. За молекулярними варіантами РМЗ у 35 хворих визначено люмінальний (А, Б), у 7 — Her2/new+, у 16 — тричленний підтипи. Усі пацієнти дали інформовану згоду на використання їх біологічних матеріалів для проведення дослідження.

Рівні цитохрому P450 та його ізоформ визначали у 58 зразках тканини РМЗ та МЖТ (5 см від пухлинного вузла). Тканини пухлин і МЖТ гомогенізували у скляному гомогенізаторі. Рівні окисненого та низькоспінового цитохрому P450 та його ізоформи CYP 19A1 визначали методом електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР) та спектрофотометрично. UV-Vis спектри в гомогенатах тканин ре-

стрували із розрахунку $0,50$ нмоль білка у 1 мл $0,1$ М фосфатного буферу (рН 7,0). Для визначення рівнів окисненої та низькоспінової форм цитохрому P450 із тканин (1 г) готували зразки у спеціальній прес-формі і досліджували на комп'ютеризованому радіоспектрометрі ЕПР PE1307 з резонатором H011. Спектри ЕПР отримували за температури рідкого азоту (-196 °C). Потужність НВЧ-джерела становила 40 мВт, частота модуляції 100 кГц та амплітуда 10 Гаус, постійна часу приймача $\tau = 0,3$ с. Як стандарт інтенсивності використовували спеціально орієнтований зразок монокристалу Al_2O_3 з визначеною концентрацією іонів Cr^{3+} . Методом подвійного інтегрування оцінювали концентрацію молекул, зіставляючи інтенсивність сигналів у спектрах ЕПР з інтенсивністю стандарту. Помилка методу інтегрування спектрів та розкид відтворення спектрів одного зразка становить не більше 2% . Імуноблотинг проводили відповідно до стандартних протоколів з антитілами проти CYP 1A2 і CYP 19A1, GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Наявність ожиріння у хворих визначали шляхом підрахунку та інтерпретації індексу маси тіла (ІМТ). $ІМТ \leq 16$ — дефіцит маси тіла; від $16,0$ до $18,5$ — недостатня маса тіла; від $18,5$ до $24,9$ — нормальна маса тіла; від $25,0$ до $30,0$ — надмірна маса тіла (передожиріння); від $30,0$ до $35,0$ — ожиріння першого ступеня; від 35 до 40 — ожиріння другого ступеня; ≥ 40 — ожиріння третього ступеня.

Дані представлені у вигляді середніх значень зі стандартним відхиленням ($M \pm SE$). Статистичний аналіз проводили із застосуванням пакета R. Різницю між показниками вважали достовірною при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведені спектри поглинання високоочищеного (комерційний препарат, «Sigma») CYP 19A1 людини (50 нмоль ферменту в 1 мл фосфатного буферу з рН 7,2) та препарату з тканини РМЗ (II стадія, люмінальний А підтип).

Індивідуальні коливання рівнів CYP 19A1 у тканині РМЗ були незначними: середній вміст цієї ізоформи в пухлинах II стадії становив $0,36 \pm 0,15$ нмоль/г тканини, у пухлинах III стадії — $0,41 \pm 0,05$ ($p > 0,05$) нмоль/г тканини. Вміст CYP 19A1 у МЖТ, що контактує з пухлинною тканиною, був дещо нижчим і також характеризувався лише незначними індивідуальними коливаннями: $0,14 \pm 0,04$ нмоль/г тканини при РМЗ II стадії проти $0,17 \pm 0,06$ нмоль/г тканини ($p > 0,05$) при РМЗ III стадії. При аналізі рівнів CYP 19A1 у тканинах РМЗ та МЖТ залежно від молекулярного підтипу пухлини також не встановлено суттєвих відмінностей, що, можливо, пов'язано з обмеженою кількістю спостережень. Цей аспект потребує подальшого дослідження.

У модельних експериментах [8] досліджені зміни у спектрах ЕПР цитохрому P450 (CYP 19A1)

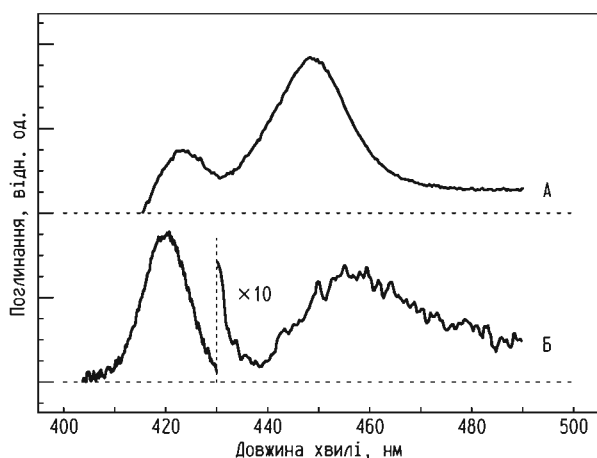


Рис. 1. UV-Vis спектри поглинання СУР 19А1: високоочищеного СУР 19А1 людини — стандарт (А), тканина РМЗ (Б)

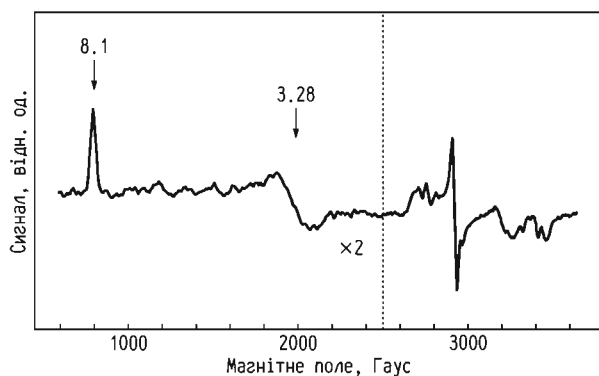


Рис. 2. Спектр ЕПР цитохрому Р450 (СУР 19А1) МЖТ, яка контактує з пухлинною тканиною РМЗ ІІІ стадії (g -фактори 8,10 та 3,28)

при його взаємодії з андростендіоном та продемонстровано появу інтенсивних сигналів ЕПР, які можуть бути маркерами метаболічної активності ферменту. Нами досліджено вплив андростендіону на спектр ЕПР СУР 19А1 МЖТ (рис. 2). Встановлено, що при утворенні комплексу андростендіону з цитохромом Р450 (СУР 19А1) МЖТ виявляються інтенсивні сигнали ЕПР з g -факторами 8,10 і 3,28, які можуть бути маркерами перетворення у МЖТ андростендіону (андростендіону) в естроген під впливом дослідженої ізоформи Р450. Відомо, що існує три основні форми естрогену: естрон (Е1), естрадіол (Е2 або 17β -естрадіол) і естріол (Е3) [2]. Е1 утворюється у шкірі та жировій тканині (ЖТ) із андростендіону (який синтезується у надниркових залозах) і є основною формою естрогену, який функціонує у жінок у постменопаузальний період [3]. Е2 є основним гормоном, який синтезується у пременопаузальний період у яєчниках, але у постменопаузальний період він залишається біологічно активним і діє шляхом зв'язування з рецептором естрогену- α і - β . Таким чином, визначені нами зміни сигналу ЕПР можуть свідчити про активну участь МЖТ у метаболізмі естрогенів і, відповідно, розвитку РМЗ, особливо у жінок у постменопаузальний період.

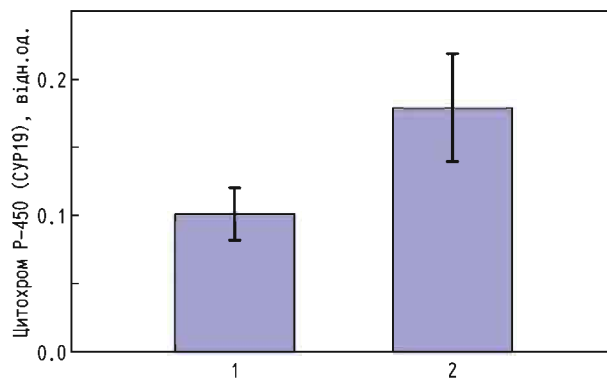


Рис. 3. Рівні СУР 19А1 у тканині РМЗ ІІ стадії залежно від маси тіла пацієнток: 1 — ІМТ ≤ 25 кг/м²; 2 — ІМТ ≥ 25 кг/м²

Дослідження активності цитохрому Р450 (СУР 19А1) (особливо його низькоспінової форми) у тканині РМЗ залежно від накопичення ЖТ у МЗ (відсутність/наявність у пацієнток передожиріння чи ожиріння) дозволило виявити високі рівні окисненої ($g = 2,42$) і низькоспінової ($g = 2,25$) форм СУР 19А1, вміст яких корелює з ІМТ — ≤ 25 та ≥ 25 кг/м² (відповідно $0,10 \pm 0,02$ відн. од. проти $0,18 \pm 0,05$ відн. од., $0,05 < p < 0,1$) (рис. 3).

Також одержано попередні дані щодо зростання у тканині РМЗ і МЖТ ізоформи СУР 1А2, що корелює з підвищенням рівня СР у мітохондріях та стадією захворювання. Це може свідчити, що СУР 1А2 регулює енергетичний метаболізм клітин РМЗ та здатний посилювати клітинну гіпоксію.

Проведено аналіз активності цитохрому Р450 (ізоформи СУР 19А1 і СУР 1А2) у МЖТ жінок пре- та постменопаузального віку з різною масою тіла (табл. 2). Встановлено вищі рівні обох ізоформ ферменту та підвищений ризик прогресування захворювання у пацієнток з ІМТ ≥ 25 кг/м² при більшій тривалості впливу естрогенів (≥ 27 років). Значимо, що наявність ожиріння та вплив естрогенів відносять до чинників ризику виникнення та перебігу РМЗ. Це дозволяє припустити, що активність цитохрому Р450 (ізоформи СУР 1А2 і СУР 19А1) також може бути потенційним предикторним чинником.

Таблиця 2

Активність ізоформ цитохрому Р450 і відносний ризик прогресування РМЗ

Чинники ризику	Цитохром Р450 (СУР 1А2)		Низькоспінова форма цитохрому Р450 (СУР 19А1)	
	Кількість хворих, n = 58	OR	Кількість хворих, n = 58	OR
ІМТ, кг/м ²				
≤ 25	30	1,58	30	1,43
≥ 25	28	1,61	28	1,58
Менопаузальна стадія:				
пременопаузальна	28	1,43	28	1,21
постменопаузальна	30	1,75	30	1,34
Тривалість експозиції естрогену:				
< 27	29	1,49	29	1,08
≥ 27	29	1,68	29	1,64

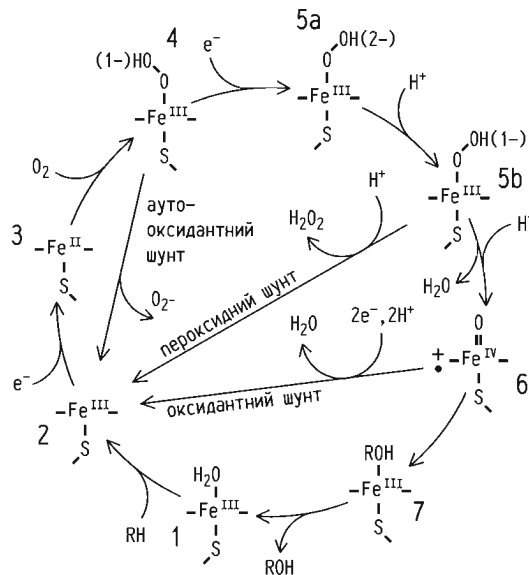


Рис. 4. Каталітичний цикл цитохромів P450 [1]

На рис. 4 продемонстровано каталітичний цикл цитохрому P450, у якому реалізується спроможність клітин метаболізувати гормони та канцерогени. Ізоформа цитохрому P450 (CYP 1A2) каталізує гідроксилювання естрогену, перетворюючи естрон (E1) і естрадіол (E2) у 2-гідроксиестрадіол (2-OHE1), та окиснює у 16 α -положенні естрадіол і естрон.

У синтезі естрогенів бере участь ароматаза (CYP 19A1), субстратом для якої служать андрогени, а саме андростендіон, тестостерон і 16-гідрокситестостерон. З високою специфічністю ця ізоформа P450 перетворює їх у відповідні естрогени: естрон, естрадіол і естріол [5, 9]. Оскільки і субстрати, і продукти цього ферменту є потужними гормонами, зміни в його діяльності мають значний вплив на естрогенний і андрогенний обмін. Більшість естрогенів у пременопаузальний період синтезується яєчниками. Переважним тканинним джерелом естрогену після менопаузи є екстраоваріальна підшкірна ЖТ. Тривалий вплив надлишку естрогену підвищує ризик розвитку РМЗ. Естроген і його метаболіти можуть викликати гіперпроліферацію і неопластичну трансформацію клітин МЗ і ендометрія за рахунок посилення проліферації та пошкодження ДНК.

Цитохром P450 — це універсальна монооксигеназа; значна частка його ізоформ CYP 1A2, CYP 2E1, CYP 19A1 у клітинах пухлин може перебувати у неактивному стані ($g = 2,42$), а при коекспресії донорів електронів вони переходять у низькоспіновий стан ($g = 2,25$). Зв'язування гормонів із цитохромом P450 викликає зниження окисно-відновного потенціалу білка на 100 мВ, що робить сприятливими умови перенесення електрона з NADH або NADPH на гормон. Це супроводжується зміною спінового стану гемового заліза в активному центрі фермен-

ту і конформації білка. Відомо, що естрогени виводяться з організму через етап метаболічної конверсії у неактивні метаболіти. Першим кроком у їх метаболізмі є гідроксилювання, яке каталізується цитохромом P450. У МЗ, яєчнику, матці при метаболізмі 2-гідроксиестрадіолу і 4-гідроксиестрадіолу у каталітичному циклі CYP 1A2 і CYP 19A1 можуть утворюватися вільно радикальні стани гормонів (убісеміхінони і хінони), здатні пошкоджувати клітини тканин та ініціювати процес канцерогенезу в МЗ. Зміни активності цитохрому P450 можуть не лише впливати на інтенсивність дії гормонів, але також змінювати профіль їх фізіологічного ефекту в тканинах-мішенях.

ВИСНОВКИ

1. Виявлені високі рівні цитохрому P450 у пухлинах та МЖТ хворих на РМЗ, що обґрунтовує його потенційне застосування як біомаркера при прийнятті рішень щодо персоналізованих схем гормональної терапії.

2. Підвищення активності ізоформ P450 (CYP 1A2 і CYP 19A1) у МЖТ може бути фактором ризику прогресування РМЗ, особливо за наявності ожиріння та із підвищенням тривалості впливу естрогенів.

Робота виконана за підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України 2017–2021 рр. «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (№ держреєстрації 0117U002034).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kaluka D. Spectral characterization of cytochromes P450 active site and catalytic intermediates. 2012 (http://epublications.marquette.edu/dissertations_mu/231).
2. Gui G, Jun SB, Jin X, *et al.* Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 2013; **494**: 238–42.
3. Burlaka AP, Vovk AV, Motuzuk IM, *et al.* The redox-state indices of breast adipose tissue is important factor of tumor microenvironment in patients with breast cancer. *Oncology* 2019; **21**: 130–4 (in Ukrainian).
4. Androustopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome 450 CYP 1A1: wider roles in cancer progression and prevention *BMC Cancer* 2009; **9** (1): 187–94.
5. Bulun SE, Simpson ER. Breast cancer and expression of aromatase in breast adipose tissue. *Trends Endocrin Metab* 1994; **5** (3): 113–20.
6. Murray GI, Patimalla S, Stewart KN, *et al.* Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer. *Histopathology* 2010; **57**: 202–11.
7. Hong ChCh, Tang BK, Hammond GL, *et al.* Cytochrome P450 1A2 (CYP 1A2) activity and risk factors for breast cancer: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res* 2004; **6** (4): R352–R365.
8. Pochapsky TC, Wong N, Zhuang Y, *et al.* NADH reduction of nitroaromatics as a probe for residual ferric form high-spin in a cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2018; **1866** (1): 126–133.
9. Zhao H, Zhou L, Shangguan AJ, Bulun SE. Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. *J Mol Endocrinol* 2016; **57** (1): R19–R33.

ACTIVITY AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CYTOCHROME P450 IN TUMORS AND BREAST ADIPOSE TISSUE OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

A.P. Burlaka¹, I.M. Motuzuk²,
O.I. Sydoruk², S.V. Virko³

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine

²Bogomolets National Medical University

³V.E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics,
NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Cytochrome P450 (CYP) is an oxygenase that is involved in the biosynthesis and metabolism of estrogens and in tumor response to anti-estrogen therapy, so determining the role of CYP in the etiopathogenesis of breast cancer (BC) is important information and to understand the mechanism of sensitivity. **Aim:** to investigate cytochrome P450 levels (in oxidized and low-spin states) and CYP 1A2, CYP 19A1 isoforms in BC and mammary adipose tumors (MAT) in patients with BC. **Object and methods:** 58 samples of tumor tissue and mammary adipose tissue (5 cm from tumor node) of patients with stage II–III breast cancer (37 and 21 patients respectively) with different body mass index (BMI) — ≤ 2 and ≥ 25 kg/m² were studied. The levels of oxidized and low-spin cytochrome P450 and its CYP 19A1 isoforms were examined by electron paramagnetic resonance and spectrophotometrically. Immunoblotting was performed according to standard protocols with antibodies against CYP 1A2, CYP 19A1, GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). **Results:** high levels of cytochrome

P450 (CYP 19A1 and CYP 1A2 isoforms) were detected in stage II and III BC tissue and MAT. It is established that the formation of the P450 complex (CYP 19A1) with androstenedione in MAT of patients with BC reveals intense EPR signals with g factors of 8.1 and 3.28, which may be a marker of the metabolic activity of the enzyme. The accumulation of adipose tissue alters the activity of cytochrome P450, especially its low-spinous form; the increase in levels of oxidized ($g = 2.42$) and low-spin ($g = 2.25$) forms of the enzyme correlates with an increase in IBM (≥ 25 kg/m²). Increased levels of CYP 1A2 in tissue and MAT have also been established, suggesting a possible effect of CYP 1A2 on the energy metabolism of BC cells. **Conclusions:** have found high levels of cytochrome P450 in tumors and MAT in patients with BC, which has potential application as a biomarker in decision-making on personalized hormone therapy regimens. Increased CYP 1A2 and CYP 19A1 activity in MAT may be a risk factor for progression of BC, especially in the presence of obesity and with increased duration of estrogen exposure.

Key Words: breast cancer, tumors, mammary adipose tissue, cytochrome P450, CYP 1A2, CYP 19A1, obesity.

Адреса для листування:

Бурлака А.П.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: apburlaka@gmail.com

Одержано: 22.08.2019