

А.П. Бурлака
С.В. Вірко
В.А. Чернобай

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

РОЛЬ ІЗОФОРМ ЦИТОХРОМУ P450 У ПЕРЕБІГУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЗАЛЕЖНО ВІД МОЛЕКУЛЯРНОГО ПІДТИПУ ПУХЛИНИ

Ключові слова: рак молочної
залози, мамарна жирова
тканина, цитохром P450,
естрогени, супероксидні
радикали, виживаність.

Мета: дослідити рівні ізоформ цитохрому P450 CYP 1A2, CYP 1B1 та CYP 19A1 у пухлинній та мамарній жировій тканині хворих на рак молочної залози (РМЗ) різних молекулярних підтипів з нормальною та надлишковою масою тіла. **Об'єкт і методи:** у дослідженні використано операційний матеріал 73 хворих на РМЗ стадій II (n=40) та III (n=33) із середнім віком $48,2 \pm 10,2$ року. Люмінальний А молекулярний підтип (ЛАМП) РМЗ відмічали у 35 хворих; тричі негативний молекулярний підтип (ТНМП) — у 38 пацієнток. У зразках пухлинної та мамарної жирової тканини методом електронного парамагнітного резонансу та спектрофотометрично визначали рівні цитохрому P450 та його ізоформ CYP 1A2, CYP 1B1 і CYP 19A1. Ферментативне утворення адуктів естрогенів визначали методом газорідної хроматографії. Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакету R (www.r-project.org). **Результати:** при РМЗ різного молекулярного підтипу виявляють різні рівні ізоформ цитохрому P450. Рівні CYP 19A1 і CYP 1B1 в пухлинній тканині хворих з РМЗ ТНМП були в 1,8 разу вищими, ніж у хворих з РМЗ ЛАМП. Особливо виразним було зростання CYP 19A1 у пацієнток з ТНМП РМЗ віком ≥ 50 років та/або з індексом маси тіла (ІМТ) ≥ 25 кг/м². Співвідношення рівнів CYP 1A2 було оберненим. У хворих на ТНМП РМЗ вищою була швидкість генерування супероксидних радикалів у пухлинній та жировій тканині, що контактувала з нею. Виявлено кореляційну залежність між високим рівнем CYP 1B1 і низьким CYP 1A2 та гіршою 5-річною виживаністю без рецидивів у пацієнток як із ТНМП, так і з ЛАМП РМЗ. Показано зв'язок між підвищенням рівня маркера окиснення ДНК (8-OHdG) в сечі та загальною виживаністю хворих на РМЗ. **Висновки:** спектр і виразність змін рівнів ізоформ P450 залежать від молекулярного підтипу РМЗ: у хворих на РМЗ ТНМП порівняно з ЛАМП рівні CYP 19A1 і CYP 1B1 значно вищі, а рівень CYP 1A2 — суттєво нижчий. Потенційними предикторами несприятливого перебігу ТНМП і ЛАМП РМЗ можуть бути рівень цитохромів CYP 1A2 і CYP 1B1, індекс маси тіла пацієнток і тривалість впливу естрогенів.

Дані епідеміологічних та клінічних досліджень вказують на те, що ризики виникнення та несприятливого перебігу раку молочної залози (РМЗ) пов'язані з генетичними, метаболічними факторами та особливостями способу життя, які впливають на синтез і перетворення статевих гормонів, зокрема можуть спричиняти тривале підвищення рівня естрогенів. До критичних щодо розвитку РМЗ факторів відносять наявність ожиріння. Існують дані, які свідчать, що окислювальний стрес, зокрема, у жировій тканині (ЖТ), може бути зв'язуючою ланкою між ожирінням та метаболічними порушеннями при ініціації та прогресуванні злоякісних новоутворень [1, 2]. Крім того, у ЖТ є можливим зумовлений ферментативною активністю ароматази синтез

естрогенів, який набуває особливого патогенетичного значення у жінок в період постменопаузи [3].

У тканинах-мішенях, де відбувається синтез і метаболізм стероїдних гормонів (включаючи естрогени), експресується ізоформа цитохрому P450 CYP 19A1 — монооксигеназа, що через вплив на активність ароматази каталізує останні стадії біосинтезу естрогенів, впливає на їх функції як регуляторів росту та диференціювання клітин [3]. Естрогени виводяться з організму шляхом метаболічного перетворення на неактивні метаболіти. Першим етапом їх метаболізму є гідроксилювання, каталізоване цитохромом P450 (CYP). Оскільки більшість ізоформ CYP експресуються в печінці, метаболізм естрогенів в основному відбувається у цьому органі.

Основний метаболіт естрадіолу (2-гідроксіестрадіол) каталізується в печінці та інших тканинах CYP 1A2 та CYP 1A1. CYP 1B1, який експресується в тканинах-мішенях естрогенів, включаючи молочну залозу, яєчники та матку, каталізує 4-гідроксилювання естрадіолу. Оскільки при метаболізмі 4-гідроксіестрадіолу генеруються супероксидні радикали (СР) з утворенням семіхінону та хінону, які можуть пошкоджувати клітини, специфічне та місцеве утворення 4-гідроксіестрадіолу може ініціювати канцерогенез молочних залоз. Жіночі стероїдні гормони та їх метаболіти, посилюючи генерування СР у клітинах РМЗ, активують сигнальні шляхи, які беруть участь у виживанні та проліферації клітин РМЗ, викликають прогресування пухлин [4–7].

Мета роботи: дослідити рівні ізоформ цитохрому Р450 CYP 1A2, CYP 1B1 та CYP 19A1 у пухлинній та мамарній жировій тканині хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів з нормальною та надлишковою масою тіла.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використано операційний матеріал 73 хворих на РМЗ стадій II (n=40) та III (n=33), які проходили лікування в Національному інституті раку. Усі пацієнтки надали письмову інформовану згоду на використання їх біологічного матеріалу в дослідженні.

За даними визначення експресії в пухлинній тканині рецепторів стероїдних гормонів у 35 хворих відмічали люмінальний А молекулярний підтип (ЛАМП) та у 38 хворих — тричі негативний молекулярний підтип (ТНМП) РМЗ. Середній вік пацієнток — $48,2 \pm 10,2$ року (<50 років — 32, ≥ 50 років 41 жінка). Аналіз анамнестичних даних показав, що медіана тривалості впливу естрогенів до менопаузального періоду життя становила 27 років (вплив естрогену <27 років — у 36, ≥ 27 років — у 37 жінок).

Наявність ожиріння визначали шляхом підрахунку та інтерпретації індексу маси тіла (ІМТ): ІМТ <25 кг/м² — нормальна маса тіла; ІМТ $\geq 25,0$ — надлишкова маса тіла (передожиріння та ожиріння). За розрахованим показником ІМТ нормальну масу тіла відмічали у 30 пацієнток, надлишкову — у 43.

У 73 зразках тканини пухлини, 56 зразках ЖТ, яка контактувала з пухлиною, та 54 зразках ЖТ, відібраної на відстані 3 см від пухлинного вузла, визначали рівні окисненого, низькоспінового та високоспінового цитохрому Р450 та його ізоформ CYP 1A2, CYP 1B1 і CYP 19A1. Визначення цитохрому та його ізоформ проводили методом електронного парамагнітного резонансу за температури рідкого азоту та спектрофотометрично. У якості маркера молекулярної маси використовували оксидоредуктазу (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Електрофорез та ідентифікацію білків проводили відповідно до стандартних протоколів з антитіла-

ми проти CYP 1A2 і CYP 1B1, GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA) [8]. Рівні 8-охоGu у сечі хворих визначали, як описано раніше [9].

Ферментативне утворення адуктів естрогенів визначали, як описано в дослідженні [4], використовуючи метод газорідинної хроматографії.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакету R (www.r-project.org). Для визначення різниці між контрольними та експериментальними даними використовували t-критерій Стюдента, або ANOVA. Виживаність хворих (загальну (ЗВ), безрецидивну (БРВ)) аналізували за методом Каплана — Мейєра, вірогідність розбіжності між кривими виживаності визначали за допомогою log-rank тесту. Для подальшої перевірки прогностичного значення отриманих показників застосовували регресивну модель пропорційних ризиків Кокса. У багатофакторний аналіз були відібрані з однофакторного аналізу тільки значущі змінні (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1. наведені результати аналізу вмісту ізоформ цитохрому Р450 у тканині пухлин молочної залози (МЗ) хворих із різними ІМТ. У пухлинах МЗ хворих з ІМТ <25 кг/м² вміст ізоформи CYP 1B1 становив 1,84 пмоль, CYP 1A2 — 1,00 пмоль. У хворих з ІМТ ≥ 25 кг/м² виявлено зростання вмісту зазначених ізоформ цитохрому Р450 до значень 2,04 та 1,75 пмоль відповідно. У мамарній ЖТ на відстані 3 см від пухлинного вузла ці показники незалежно від ІМТ коливалися в межах $0,48 \pm 0,04$ пмоль (CYP 1A2) та $0,63 \pm 0,03$ пмоль (CYP 1B1). Зазначимо, що ізоформи цитохрому Р450 CYP 1A2 та CYP 1B1 по-різному метаболізують естрогени. Підвищення активності CYP 1B1 призводить до накопичення у тканинах канцерогенних генотоксичних 4-ОНЕ1/Е2-о-хінонів з високою реакційною здатністю, а CYP 1A2 перетворює естрогени на 2-ОНЕ1/Е2-хінони, які мають нижчий редокс-потенціал та нижчу пошкоджувальну здатність.

Представлені на рис. 2 результати свідчать, що при РМЗ різного молекулярного підтипу виявляють різні рівні ізоформ цитохрому Р450. Так, у разі РМЗ ТНМП CYP 1B1, CYP 1A2 та CYP 19A1 виявляли на рівні $0,34 \pm 0,04$, $0,13 \pm 0,03$ та $0,37 \pm 0,02$ пмоль, відповідно. При РМЗ ЛАМП ці значен-

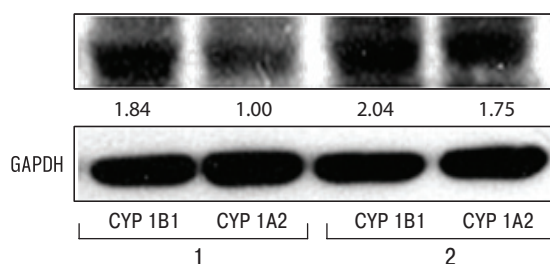


Рис. 1. Імуноблот аденотомію МЗ (смука 60 кДа): рівні ізоформ CYP 1A2 та CYP 1B1 у хворих з ІМТ <25 кг/м² (1) та ІМТ ≥ 25 кг/м² (2)

ня достовірно ($p < 0,05$ для всіх ізоформ) відрізнялися від таких при РМЗ ТНМП: відповідно $0,18 \pm 0,03$, $0,25 \pm 0,02$ та $0,21 \pm 0,03$ пмоль. Проведена оцінка рівнів досліджених ізоформ Р450 в якості прогностичного маркера розвитку РМЗ свідчить, що у хворих на РМЗ ТНМП реєструються рівні СYP 19A1 і СYP 1B1, які у 1,8 разу вищі, ніж у хворих з РМЗ ЛАМП. Особливо виразним було зростання СYP 19A1 у пацієток з ТНМП РМЗ віком ≥ 50 років та/або ІМТ ≥ 25 кг/м². Співвідношення рівнів СYP 1A2 зворотнє (при РМЗ ТНМП у 1,9 разу нижче, ніж при РМЗ ЛАМП). Збільшення ІМТ у хворих ТНМП РМЗ супроводжується подальшим підвищенням рівнів СYP 19A1.

Виявлені зміни у кількісному та якісному складі ключових ферментів метаболізму естрогенів (СYP 1A2, СYP 1B1, СYP 19A1) у клітинах МЖТ викликають низку нерегульованих подій, пов'язаних з утворенням генотоксичних продуктів радикальної природи. При дії СYP 1B1 окиснення Е2 до катехолу та хінону призводить до пошкодження ДНК шляхом утворення адуктів 4-OHE2-N7-Gua (схема утворення наведена на рис. 3) та 4-OHE2-N3-Ade. Рівень адуктів залежить від часу впливу та концентрації речовин, що реагують. Продукти окиснення Е2 є радикалами та мають високий реакційний потенціал, тому утворення їх адуктів з ДНК відповідає кінетиці Міхаеліса — Ментена (константа Міхаеліса — Ментена — K_m ; каталітична ефективність — k_{cat}). При аналізі утворення адукту 4-OHE2-N7-Gua було виявлено, що $K_m = 5,3 \pm 0,4$ мкмоль/л; $k_{cat} = 53,0 \pm 1,3$ /год, що у 1,41 разу більше, ніж утворення адукту з аденіном (4-OHE2-N3-Ade, $K_m = 3,9 \pm 0,9$ мкмоль/л; $k_{cat} = 38,0 \pm 0,95$ /год). Адукти ДНК 4-OHE2-N7-Gua та 4-OHE2-N3-Ade видаляються шляхом розщеплення глікозидного зв'язку, а на місці видаленого адукту залишаються апуринові ділянки, що призводить до неправильного кодування під час реплікації ДНК та мутацій, типу трансверсій G→T [10, 11].

Як видно з результатів, представлених на рис. 4, швидкість генерування СР у пухлині та у ЖТ, що контактує з нею, хворих на ТНМП вища, ніж у пацієнтів з ЛАМП РМЗ. Обидва показники зростають за наявності надлишкової маси тіла (ІМТ ≥ 25 кг/м²), особливо у пацієток з ТНМП РМЗ. Фізіологічні концентрації СР мають вирішальне значення для забезпечення виживання клітин, а генерування нерегульованих рівнів є шкідливим для клітин і вважається ключовим фактором для розвитку ряду захворювань, зокрема таких, як нейродегенеративні, серцево-судинні та рак. Клітини пухлин зазвичай піддаються впливу високих рівнів СР, що додатково стимулює формування злоякісного фенотипу через стійкі стимули до проліферації, ухилення від апоптозу, ангиогенезу, інвазивності та метастазування. Навіть фізіологічні концентрації естрогену або його метаболітів запускають реакції генерування реактивних форм кисню (РФК), які індукують синтез ДНК, посилюють фосфорилування кіназ

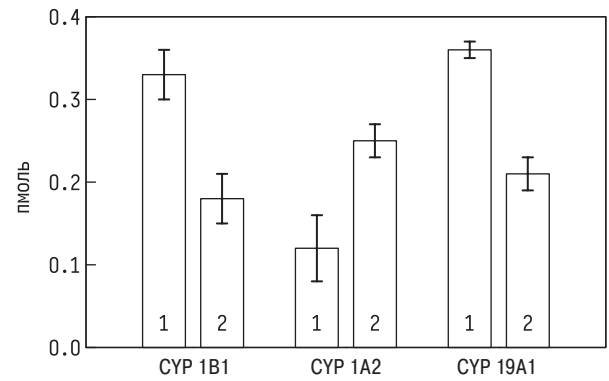


Рис. 2. Вміст СYP 1B1, СYP 1A2 та СYP 19A1 у пухлинах ТНМП (1) та ЛАМП (2) РМЗ

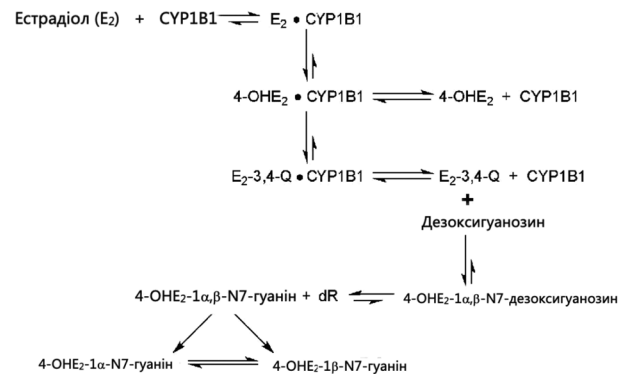


Рис. 3. Схема реакцій опосередкованого СYP 1B1 окиснення Е2 до Е2-3,4-Q та утворення адукту 4-OHE2-N7-Gua [5]

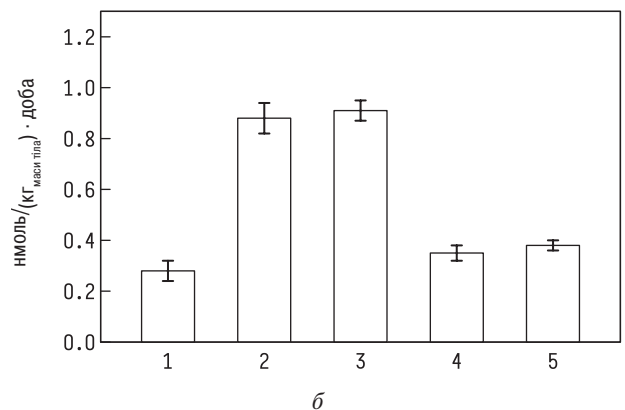
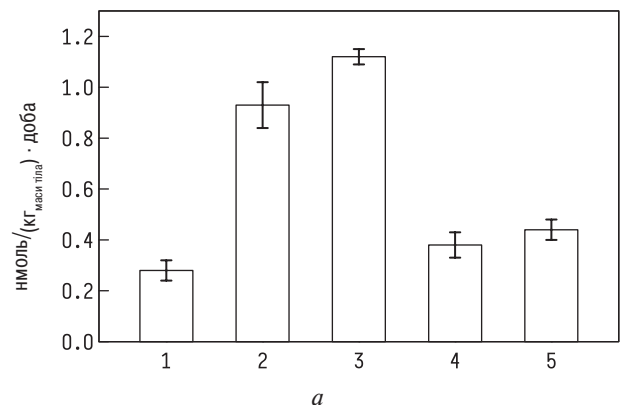


Рис. 4. Рівні СР у пухлинах та ЖТ хворих на ТНМП (а) та ЛАМП (б) РМЗ: 1 — у ЖТ на відстані 3 см від пухлинного вузла; 2 — у пухлинній тканині (ІМТ < 25 кг/м²); 3 — у пухлинній тканині (ІМТ ≥ 25 кг/м²); 4 — у ЖТ, яка контактує з пухлиною (ІМТ < 25 кг/м²); 5 — у ЖТ, яка контактує з пухлиною (ІМТ ≥ 25 кг/м²)

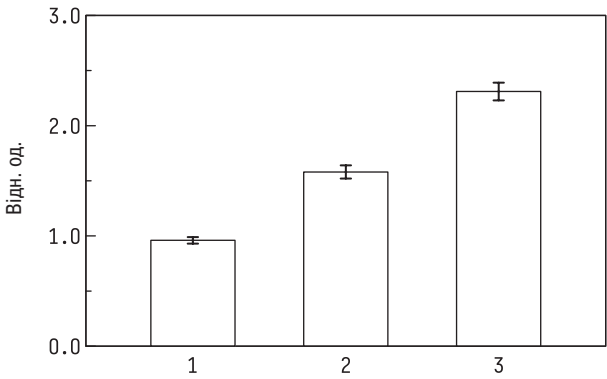


Рис. 5. Рівні семіхінону, які визначаються: 1 — у ЖТ на відстані 3 см від пухлини ($0,96 \pm 0,03$); 2 — у ЖТ, яка контактує з пухлиною ($1,58 \pm 0,06$); 3 — в аденокарциномі МЗ ($2,31 \pm 0,08$)

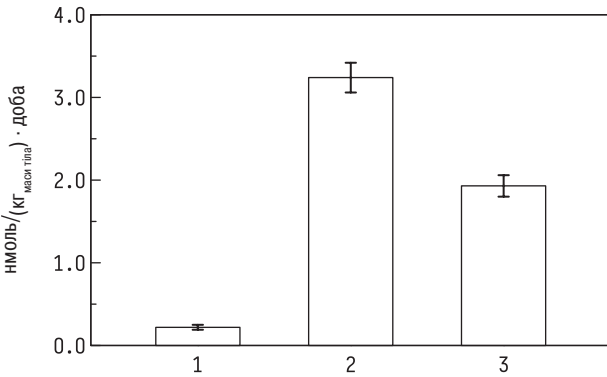


Рис. 6. Рівні швидкості утворення маркера окисного пошкодження ДНК (8-oxodG) в сечі здорових жінок (1) та хворих на ТНМП (2) і ЛАМП (3) РМЗ

та активують фактори транскрипції (зокрема, AP-1, NRF1, E2F, NF-kB та CREB). Утворені під час метаболізму естрогенів сполуки шляхом індукції геномної нестабільності та передачі сигналу до редокс-залежних факторів транскрипції спричиняють трансформацію клітин, міграції пухлинних клітин та їх інвазії [12]. Ми підтримуємо думку, що індукування естрогеном СР є ключовим механізмом канцерогенезу, тому що естроген-індуковані РФК можуть функціонувати як незалежні модифікатори фосфатаз і кіназ для активації факторів транскрипції генів-мішеней, які беруть участь у прогресуванні раку.

Нами виявлено значне накопичення семіхінонів у ЖТ, яка контактує з пухлинним вузлом та тканині аденокарциноми у порівнянні із ЖТ, яка віді-

брана на відстані 3 см від пухлини (рис. 5). Утворені нерегульовані рівні семіхінонів викликають пошкодження ДНК та окиснення SH-груп у білках, зокрема FeS-білках мітохондрій. Катехол естроген-3,4-хінон вважається основним канцерогенним метаболітом естрогенів. Існує дедалі більше підтверджень критичної ролі 4-OHE2 у гормональному канцерогенезі через утворення адуктів з ДНК та СР, що, нарешті, сприяє трансформації нормальних клітин епітелію МЗ та нерегульованому росту клітин РМЗ [13]. Ми підкреслюємо онкогенну роль СР та 4-OHE2 в індукованому катехол-естрогенами канцерогенезі МЗ.

Досліджені також концентрації окисно-індукованих модифікацій гуаніну — 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину (8-OHdG) у сечі хворих на РМЗ (рис. 6). Встановлено, що рівні 8-OHdG у сечі пацієнтів з ТНМП РМЗ у 13 раз перевищують значення цього показника у здорових людей, та у 1,8 рази вищі, ніж у хворих з ЛАМП РМЗ. Існує значний взаємозв'язок між підвищеним рівнем 8-OHdG у сечі та низьким рівнем виживаності хворих. Методом багатофакторного аналізу Кокса виявлено, що рівні 8-OHdG у хворих на ТНМП та ЛАМП РМЗ є незалежним прогностичним маркером виживаності (відносний ризик (ВР) 2,12 (95% довірчий інтервал (ДІ) 1,48–3,005). Вірогідно, це зумовлюють зміни у геномі клітин МЗ, які індукуються окисною атакою СР, викликану естроген-індукованим окиснювальним стресом у поєднанні з рецептор-опосередкованою проліферацією пошкоджених клітин. Раніше нами було показано, що концентрації окисно-індукованих модифікацій гуаніну (8-OHdG) у ДНК особливо підвищені на ранніх етапах пухлинного процесу у порівнянні з пухлинами на більш пізніх стадіях. Це свідчить, що СР відіграють важливу роль на ранніх стадіях канцерогенезу [14, 15].

Проведено регресійний аналіз взаємозв'язку між рівнями СYP 1A2, СYP 1B1 в пухлині та віком і ІМТ пацієнток, молекулярним підтипом РМЗ, тривалістю впливу естрогену до постменопаузального періоду життя жінок (таблиця). Виявлено позитивну асоціацію активності цитохрому Р450 з ризиком несприятливого перебігу РМЗ, особливо у хворих на ТНМП РМЗ, низьким рівнем СYP 1A2 та високим СYP 1B1 порівняно з пацієнтами з ЛАМП РМЗ. Потенційними предикторами можуть бути також ІМТ пацієнток та тривалість впливу естрогену.

Таблиця

Результати аналізу кореляцій високих рівнів СYP 1B1 та низьких СYP 1A2 ізоформ Р450 з загальною 5-річною виживаністю хворих на РМЗ

Характеристики	Однофакторний аналіз, ВР (95% ДІ)	p	Багатофакторний аналіз, ВР (95% ДІ)	p
Вік (<50 проти ≥50 років)	0,83 (0,548–1,310)	0,44	Не проводили	–
ІМТ (<25 проти ≥25 кг/м²)	0,16 (0,12–0,27)	<0,001	0,26 (0,16–0,42)	0,001
ЛАМП проти ТНМП РМЗ	0,22(0,07–0,66)	0,003	0,37(0,12–1,20)	0,10
Тривалість впливу естрогену до менопаузального періоду життя (< 27 проти ≥27 років)	2,51 (1,53–4,10)	<0,001	1,34 (0,75–2,37)	0,33
Високі рівні СYP 1B1 та низькі СYP 1A2 проти низьких рівнів СYP 1B1 та високих СYP 1A2	2,47 (1,25–2,87)	0,020	3,42 (1,25–3,91)	0,02

Оцінили також вплив різних рівнів білків СУР 1В1 і СУР 1А2 на прогноз перебігу захворювання у пацієнток з різними молекулярними підтипами РМЗ: аналіз БРВ хворих за Капланом — Мейером показав значну відповідність між високим вмістом СУР 1В1 і низьким СУР 1А2 та гіршою 5-річною БРВ у пацієнток як з ТНМП ($p = 0,05$; $BP = 0,63$ (95% ДІ 0,27–1,78)), так і з ЛАМП РМЗ ($p = 0,01$; $BP = 0,23$ (95% ДІ = 0,14–0,81)) (рис. 7, 8). Показники БРВ пацієнток з високими рівнями СУР 1А2 та низькими СУР 1В1 були кращими.

Таким чином, виявлені зміни у функціонуванні цитохрому Р450, а саме зростання активності СУР 1В1, СУР 19А1 та зниження активності СУР 1А2 може відіграти значну роль у тривалості експозиції тканин до метаболітів естрогену, оскільки вони головним чином відповідають за метаболізм 17β -естрадіолу після його перетворення на естрон. СУР 1А2 є основним ферментом І фази детоксикації і на нього припадає близько 15,0% загального вмісту цитохрому в печінці, де він каталізує 2-гідроксильовання 50,0% всього естрогену. Збільшення утворення 2-гідроксильованих естрогенів відповідало б зниженому ризику РМЗ, оскільки 2-гідроксиестрогени слабо зв'язуються з рецепторами естрогену та мають менший потенціал до пошкоджень клітин мо-

лочної залози. Зростання активності ізоформ СУР 1В1 і СУР 19А1 у ЖТ сьогодні визначається фактором ризику прогресування РМЗ, особливо за наявності ожиріння та підвищення тривалості впливу естрогену, а терапевтичне підвищення активності СУР 1А2 може сприяти зниженню ризику виникнення РМЗ [16, 17]. Нерегульоване генерування СР та РФК діє як суттєвий ефектор для виникнення та посилення геномної нестабільності та трансдукції окисно-відновної сигналізації. Опосередковане естрогеном генерування СР мітохондріями спричиняє мутації ДНК та пошкодження білків мітохондрій. Це зумовлює зміни в енергетичному обміні та модулювання кількох окисно-відновних білків, відповідальних за проліферацію клітин та антиапоптоз. Отже, естрогени, посилюючи толерантність до СР та РФК, завдяки збільшенню генерування СР, у кінцевому підсумку призводять до естроген-опосередкованого канцерогенезу та злоякісної трансформації. Регулювання естроген-опосередкованої толерантності до СР може забезпечити новий та ефективний підхід селективного протипухлинного впливу без пошкодження нормальних клітин. Для цього потрібно навчитися оцінювати точний редокс-гомеостаз у різних компартментах клітин та їх мікрооточенні і використовувати як новий шлях для оптимізації терапії естроген-опосередкованого раку.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що потенційним предиктором несприятливого перебігу ТНМП і ЛАМП РМЗ може бути рівень цитохромів СУР 1А2 і СУР 1В1, а також ІМТ пацієнток і тривалість впливу естрогенів.

2. Показано, що спектр і виразність змін рівнів ізоформ Р450 залежать від молекулярного підтипу РМЗ: у хворих на РМЗ ТНМП порівняно з пацієнтками з ЛАМП рівні СУР 19А1 і СУР 1В1 значно вищі, а рівень СУР 1А2 — суттєво нижчий.

3. Виявлено кореляційну залежність між високим рівнем СУР 1В1 і низьким СУР 1А2 та гіршою 5-річною БРВ у пацієнток як з ТНМП, так і ЛАМП РМЗ.

4. Швидкість генерування СР в пухлинній та жировій тканині, яка контактує з пухлиною, вища при РМЗ ТНМП, порівняно з ЛАМП; за наявності надлишкової маси тіла цей показник зростає в обох групах хворих.

5. Показано зв'язок між підвищенням рівня маркера окиснення ДНК (8-ОНдГ) в сечі та ЗВ хворих на РМЗ.

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. Lefranc C, Friederich-Persson M, Palacios-Ramirez R, Aurelie Nguyen Dinh Cat. Mitochondrial oxidative stress in obesi-

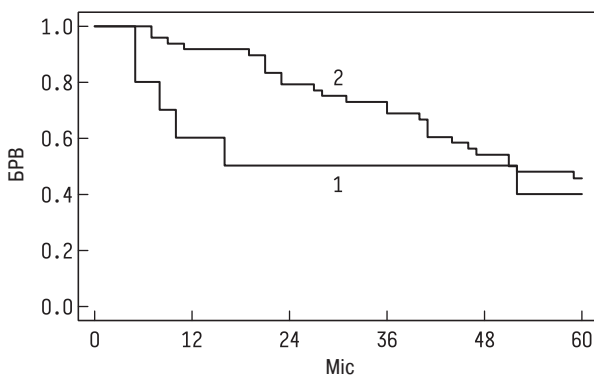


Рис. 7. БРВ хворих на ТНМП РМЗ залежно від рівнів ізоформ цитохрому Р450: 1 — низькі рівні СУР 1А2 та високі СУР 1В1; 2 — високі рівні СУР 1А2 та низькі СУР 1В1 (аналіз за методом Каплана — Мейера, $p = 0,05$)

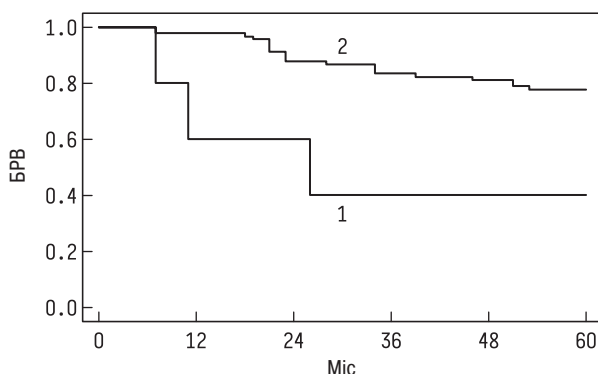


Рис. 8. БРВ хворих на ЛАМП РМЗ залежно від рівнів ізоформ цитохрому Р450: 1 — низькі рівні СУР 1А2 та високі СУР 1В1; 2 — високі рівні СУР 1А2 та низькі СУР 1В1 (аналіз за методом Каплана — Мейера, $p = 0,05$)

- ty: role of the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinol* 2018; **238** (3): R143–R159.
2. Horn J, Vatten L. Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. *Int J Women's Health* 2017; **2017** (9): 265–72.
 3. Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* 2012; **77** (1–2): 27–35.
 4. Belous AR, Hachey DL, Dawling Sh, *et al.* Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res* 2007; **67** (2): 812–7.
 5. Kalyanaraman B, Sealy RC, Sivarajah K. An electron spin resonance study of o-semiquinones formed during the enzymatic and autooxidation of catechol estrogens. *J Biol Chem* 1984; **259**: 14018–22.
 6. Akanni A, Abul-Hajj YJ. Estrogen-nucleic acid adducts: dissection of the reaction of 3,4-estrone quinone and its radical anion and radical cation with deoxynucleosides and DNA. *Chem Res Toxicol* 1999; **12** (12): 1247–53.
 7. Embrechts J, Lemiere F, Van Dongen W, *et al.* Detection of estrogen DNA-adducts in human breast tumor tissue and healthy tissue by combined nano LC-nano ES tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003; **14** (5): 482–91.
 8. Burlaka AP, Motuzyuk IM, Sydorchuk OI, Virko SV. Cytochrome P-450, estrogen metabolites and superoxide radicals in breast cancer initiation and progression. *Oncology* 2020; **22** (1–2): 42–6. in Ukrainian
 9. Burlaka A, Rudiuk T, Burlaka A, Kolesnik O. 8-hydroxydeoxyguanosine as an independent prognostic factor in patients with metastatic colorectal cancer. *Archives Balkan Medical Union* 2019; **54** (3): 445–54.
 10. Cavalieri EL, Rogan EG. Role of aromatic hydrocarbons in disclosing how catecholestrogens initiate cancer. *Adv Pharmacol* 1998; **42**: 837–40.
 11. Loeb LA, Preston BD. Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet* 1986; **20**: 201–30.
 12. Hui Tian, Zhen Gao, Gang Wang, Huizhong Li, Jun Nian Zheng. Estrogen potentiates reactive oxygen species (ROS) tolerance to initiate carcinogenesis and promote cancer malignant transformation. *Tumour Biol* 2016; **37** (1): 141–50.
 13. Okoh V. 4-hydroxy estradiol-induced oxidant-mediated signaling is involved in the development of breast cancer. FIU Electronic Theses and Dissertations. 2010. <https://digitalcommons.fiu.edu/etd/348> DOI: 10.25148/etd.FI11041501
 14. Burlaka AP, Virko SV, Burlaka AA, *et al.* Cytochrome P450 content in primary tumors and liver metastases of patients with metastatic colorectal cancer. *Exp Oncol* 2020; **42** (4): 330–2.
 15. Burlaka AA, Vovk AV, Burlaka AP, Kolesnik OO. DNA oxidation in patients with metastatic colorectal cancer: clinical significance of 8-hydroxydeoxyguanosine as an independent prognostic factor. *Exp Oncol* 2019; **41** (1): 26–31.
 16. Sin-Aye Park. Catechol estrogen 4-hydroxyestradiol is an ultimate carcinogen in breast cancer. *Biomed Sci Letters* 2018; **24**: 143–9.
 17. Sateesh R, Aparna Rajeshwar Rao Bitla, Sandya Rani Budugu, *et al.* Oxidative stress in relation to obesity in breast cancer. *Ind J Cancer* 2019; **56** (1): 41–4.

THE ROLE OF CYTOCHROME P450 ISOFORMS IN THE BREAST CANCER COURSE DEPENDING ON THE TUMOR MOLECULAR SUBTYPE

A.P. Burlaka, S.V. Virko, V.A. Chernobay

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

Summary. Aim: to investigate the levels of cytochrome P450 and its CYP 1A2, CYP 1B1 isoforms in tumor tissue and mammary adipose tissue in normal weight and overweight patients with different subtypes of breast cancer (BC). **Object and methods:** The surgical tissue of 73 patients with stage II (n=40) and III (n=33) BC aged 48.2 ± 10.2 years was used in the study. Luminal A breast cancer (LABC) was diagnosed in 35 patients; 38 patients had triple-negative BC (TNBC). The level of cytochrome P450 and its CYP 1A2, CYP 1B1 and CYP 19A1 isoforms in the tumor tissue and mammary adipose tissue was examined by electron paramagnetic resonance and spectrophotometrically. Enzymatic formation of estrogen adducts was determined by gas-liquid chromatography. Statistical analysis was performed using the R project (www.r-project.org). **Results:** The diverse levels of cytochrome P450 isoforms were determined in BC of different molecular subtypes. The levels of CYP 19A1 i CYP 1B1 isoforms in the tumor tissue of patients with TNBC were 1.8 times higher as compared to the patients with LABC. Increase in CYP19A1 level was especially evident in TNBC patient aged ≥50 years and body mass index (BMI) of ≥25 kg/m². Relation between CYP 1A2 levels was the opposite. The rate of superoxide radicals' production in both tumor tissue and tumor bordering adipose tissue was higher in TNBC patients. The correlation between high CYP 1B1 level together with the low level of CYP 1A2 and worse 5 years relapse-free survival in both TNBC and LABC patients was revealed. There was demonstrated a relation between increased urinary level of marker of oxidative DNA damage (8-OHdG) and overall survival of patients with BC. **Conclusions:** the spectrum and degree of changes in the levels of P-450 isoforms depend on the BC molecular subtype: levels of CYP 19A1 and CYP 1B1 are much higher, and level of CYP 1A2 is significantly lower in patients with TNBC compared to LABC patients. The level of cytochromes CYP 1A2 and CYP 1B1, patients' body mass index and the duration of estrogen exposure can serve as possible predictors of unfavorable TNBC and LABC course.

Key Words: breast cancer, mammary adipose tissue, cytochrome P450, estrogens, superoxide radicals, survival.

Адреса для листування:

Бурлака А.П.

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

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: apburlaka@gmail.com

Одержано: 17.03.2021