

**БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПУХЛИННОЇ КАХЕКСІЇ
В УМОВАХ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ВІТАМІНОМ А***І. О. ШМАРАКОВ, Н. В. ГНЕП, М. М. МАРЧЕНКО**Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: igor.shmarakov@gmail.com*

На моделі пухлинного росту карциноми Герена проведено дослідження біохімічних особливостей пухлинної кахексії у тварин зі злякисним новоутворенням в умовах різної забезпеченості вітаміном А. Встановлено, що відсутність вітаміну А в організмі з пухлиною порівняно з онкогенезом у разі нормальної забезпеченості цим есенціальним нутрієнтом супроводжується прискоренням втрати маси тіла та підвищенням негативного азотного балансу на фоні зниженого рівня глюкози, вільних жирних кислот та кетонів тїл у сироватці крові, що свідчить про посилення пухлинної кахексії в авітамінозному організмі.

Ключові слова: вітамін А, пухлинний ріст, карцинома Герена.

Розвиток злякисного новоутворення пов'язаний зі змінами метаболічних процесів, які включають порушення вуглеводного, протеїнового та ліпідного обмінів, а також локальними деструктивними процесами в пухлині та навколишніх тканинах і органах. Організм із пухлиною не адаптується до нових умов метаболізму і не в змозі зберегти чи відновити нормальний рівень обміну, наслідком чого є підвищена потреба в пластичних та енергетичних субстратах, що покривається шляхом посилення катаболізму в нетрансформованих клітинах організму. Вважається, що ріст злякисного новоутворення в організмі супроводжується розвитком синдрому пухлинної кахексії – комплексного багатофакторного паранеопластичного синдрому, що характеризується прогресуючою нутрієнтною недостатністю і зростаючою втраченою маси тіла [1–3]. Водночас функціонування організму в умовах дефіциту есенціальних нутрієнтів, що виявляється в онкологічно хворих [4], лише посилює метаболічний дисбаланс [5]. Особливої уваги в цьому аспекті заслуговують ретиноїди – група сполук, до якої належать вітамін А та його метаболіти. Нашими попередніми дослідженнями була показана залежність росту злякисного новоутворення від забезпеченості організму вітаміном А [6], що також узгоджується з результатами досліджень на подібних моделях експериментального канцерогенезу у тварин [7, 8]. Враховуючи широкий спектр метаболічної активності сполук цього класу та їх здатність регулювати ключові етапи

метаболізму [9], метою роботи було встановити особливості розвитку пухлинної кахексії у тварин зі злякисним новоутворенням в умовах різної забезпеченості вітаміном А.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували самок білих безпородних шурів з початковою масою тіла 40–50 г. Тварини були розміщені по троє в пластмасових клітках із піщаною підстилкою. Всього в експерименті було використано 50 тварин. Вода і їжа були доступні *ad libitum*, рівень споживання яких фіксувався двічі на добу. Всі тварини впродовж експерименту одержували напівсинтетичний раціон, збалансований за всіма нутрієнтами, але позбавлений вітаміну А [5]. У тварин, які утримувалися на А-дефіцитній дієті через 6 тижнів розвивалися морфологічні ознаки А-авітамінозу такі як: відсутність приросту маси тіла або приріст менше 1 г впродовж 4 діб; зупинка росту; порушення зору за візуальною оцінкою, зміна шерстяного покриву. Розвиток авітамінозу, ідентифікований за морфологічними параметрами, підтверджувався низьким рівнем ретинолу в сироватці крові дослідних тварин (< 0,35 мкмоль/л), визначений флуоресцентним методом [10].

Як модель злякисного новоутворення використовували карциному Герена (штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України), трансплантацію якої здійснювали шляхом підшкірного введення в

область стегна 0,4 мл 30%-ої суспензії пухлинних клітин у фізіологічному розчині.

Дослідних тварин було поділено на групи: група I (-A) – тварини, які після трансплантації пухлини знаходились на раціоні, позбавленому вітаміну А; група II (+A) – тварини, які до трансплантації перебували на раціоні, позбавленому вітаміну А, а починаючи з першого дня після трансплантації карциноми Герена, отримували фізіологічну дозу вітаміну А (щоденно 30 МО); група III (+AA) – тварини, які до трансплантації перебували на раціоні позбавленому вітаміну А, а починаючи з першого дня після трансплантації карциноми Герена отримували надвисокі дози вітаміну А (щоденно 3000 МО); група IV (A, дослідний контроль I) – тварини, які до і після трансплантації карциноми Герена перебували на напівсинтетичному раціоні, який містив фізіологічну дозу вітаміну А (щоденно 30 МО); група V (K-A, дослідний контроль II) – тварини, які протягом всього експерименту перебували на раціоні, позбавленому вітаміну А і яким не проводили трансплантацію карциноми Герена; група VI (K, контроль) – тварини без карциноми Герена, які знаходилися на напівсинтетичному раціоні, що містив фізіологічну дозу вітаміну А (щоденно 30 МО). Вітамін А вводили щоденно *per os* у вигляді олійного розчину ретинілацетату.

Евтаназію тварин проводили на 15-у добу після перещеплення карциноми Герена (період активного пухлинного росту) під легким ефірним наркозом та згідно з міжнародними принципами 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 тварин 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 та печінку. Сироватку одержували шляхом центрифугування зразків крові при 1500 g протягом 15 хв.

Визначення рівня сечовини, глюкози, загальних ліпідів та альбуміну проводили з використанням стандартних наборів НПП «Фелісіт-діагностика» (Дніпропетровськ). Визначення рівня кетонових тіл проводили колориметрично за методом Натальсона, вільних жирних кислот – за методом Прохорова [11].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Різниці вважалися вірогідними при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що розвиток карциноми Герена в організмі, позбавленому вітаміну А (група -A), порівняно з онкогенезом за нормальної забезпеченості цим вітаміном (група A), характеризується посиленням пухлинної кахексії, що виявляється у зниженні маси тіла на 21% порівняно з тваринами контрольної групи. Показники втрати маси тіла статистично вірогідно переважали ці параметри як у тварин без пухлини, які утримувалися на вітамін А-дефіцитному раціоні (група K-A), так і у щурів із карциномою Герена з нормальною забезпеченістю вітаміном А (група A), де відмінність від контрольних показників складала відповідно 16 і 13% (рис. 1, A). Хоча зафіксоване зниження маси тіла тварин знаходить своє логічне пояснення, виходячи із загальної тенденції тканинно-специфічної редукції м'язової і жирової тканин організму зі злоякісною пухлиною [3, 5, 12], посилення цього процесу саме в організмі з дефіцитом вітаміну А вказує на необхідність пошуку метаболічного обґрунтування виявленого явища.

Авітамінозні тварини зі злоякісним новоутворенням характеризувалися посиленням негативного азотного балансу (рис. 2). Рівень екскреції азоту щурів цієї дослідної групи (група -A) в десятки разів перевищує показники групи тварин із пухлиною (група A) та авітамінозних щурів (група K-A) (рис. 2). Посилення катаболічних процесів протеїнового обміну, що проявляється у високих показниках негативного азотного балансу тварин із карциномою Герена навіть в умовах достатнього надходження вітаміну А, узгоджується з даними літератури [1, 3, 13]. Це пов'язується з продукцією трансформованими клітинами специфічних факторів кахексії, одним з яких є протеїномобілізуючий фактор (ПМФ), що спричинює розщеплення великої кількості ендогенних протеїнів для метаболічних потреб, наслідком чого є підвищення сумарного обігу загального протеїнового пула на фоні підвищеного синтезу протеїнів у печінці та зниженого у м'язах [12–14]. Посилене дезамінування амінокислот в організмі з пухлиною може розглядатися як додатковий метаболічний шлях вивільнення відповідних оксикислот як потенційних субстратів енер-

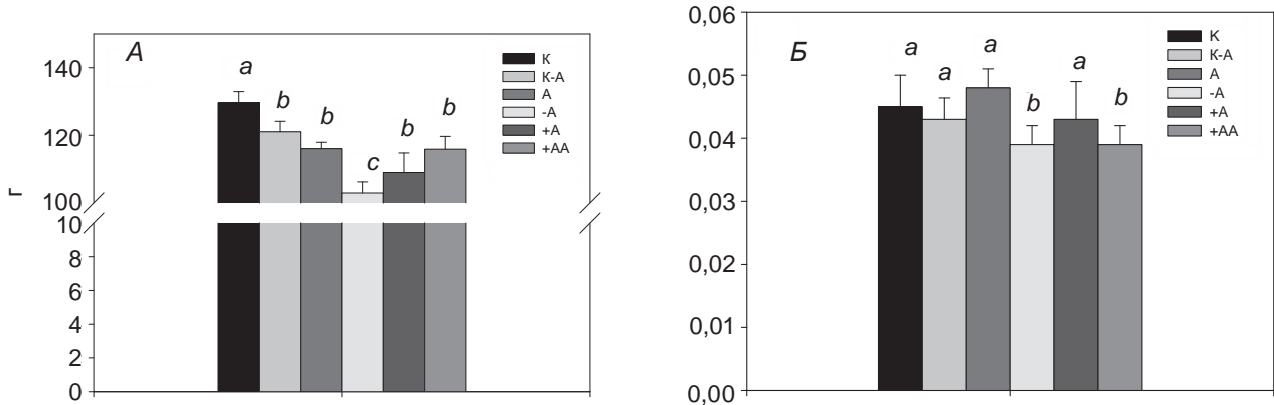


Рис. 1. Маса тварин (А) і відносна маса печінки (Б) щурів із карциномою Герена в умовах різної забезпеченості вітаміном А. Тут і на рис. 2, 3 показники, які містять однакові літерні індекси статистично не відрізняються; b – статистично вірогідна різниця порівняно з показниками з індексом a і c, $P \leq 0,05$; c – статистично вірогідна різниця порівняно з показниками з індексом a і b, $P \leq 0,05$

гетичного обміну. Висловлене припущення виявляється цілком закономірним з огляду на те, що розвиток карциноми Герена в організмі дослідних тварин навіть з нормальним забезпеченням вітаміном А супроводжується зниженням рівня глюкози в сироватці крові на 30% (таблиця). Пухлинні клітини активно споживають азот і глюкозу, що внаслідок обмеженості запасів глюкози в організмі зумовлює активізацію процесів, спрямованих на вивільнення доступних енергетичних субстратів [15]. Підвищення утилізації глюкози на фоні інсулінорезистентності та зниженої толерантності до глюкози призводить до посилення ліполізу та виснаження жирових депо [15, 16]. В нашому експерименті проявом компенсації дефіциту глюкози як основного енергетичного субстрату є підвищення рівня вільних жирних кислот у сироватці крові щурів із карциномою Герена (група А), показник якого зростає майже в два рази порівняно з тваринами без пухлини (табл.), що, очевидно, відбувається за рахунок посилення ліполізу в білій жировій тканині. Аналіз одержаних показників експериментальних та контрольних груп дозволяє стверджувати, що зазначена тенденція зумовлена саме розвитком злякисного новоутворення, а не відсутністю вітаміну А в раціоні. Виявлені зміни можна розглядати як прояв загальної тенденції прискореного ліполізу та сповільненого ліпогенезу в організмі пухлиноносія, що є наслідком дії таких медіаторів запалення як фактор некрозу пухлин α (ФНП- α), інтерлейкін- 1β (ІЛ- 1β), інтерлейкін-6 (ІЛ-6) та інтерферон- γ (ІФ- γ). ФНП- α зумовлює пригнічення експресії та

зниження активності ліпопротеїніліпази, транспортерів вільних жирних кислот та ензимів ліпогенезу таких як ацетил-КоА-карбоксілаза, синтаза жирних кислот та ацил-КоА-синтаза [5]. Цим, імовірно, пояснюється одночасне зростання як рівня вільних жирних кислот, так і загальних ліпідів у сироватці крові тварин із карциномою Герена (група А, табл.). Пухлинна кахексія завжди супроводжується не лише розвитком системної запальної відповіді, а також викидом специфічних цитокінів і катаболічних факторів, які продукуються пухлиною, як наприклад ліпідмобілізуючий фактор (відомий також як цинквмісний $\alpha 2$ -глікопротеїн) [1, 5, 15]. Наслідком посиленого ліполізу в організмі зі злякисним новоутворенням виявляється підвищення рівня циркулюючих

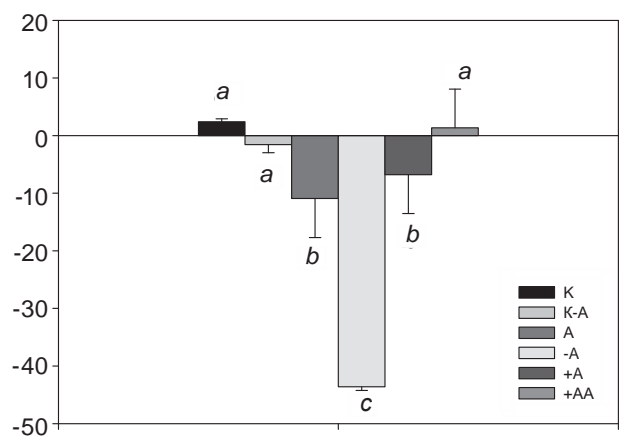


Рис. 2. Азотний баланс щурів із карциномою Герена в умовах різної забезпеченості вітаміном А

Рівень глюкози, вільних жирних кислот, кетонових тіл і загальних ліпідів у сироватці крові щурів із карциномою Герена в умовах різної забезпеченості вітаміном А ($M \pm m$, $n = 6$)

Група	Глюкоза, ммоль/л	Вільні жирні кислоти, ммоль/л	Кетонові тіла, ммоль/л	Загальні ліпіди, г/л
К	5,96 ± 0,90 ^a	0,23 ± 0,09 ^a	0,03 ± 0,02 ^a	5,29 ± 0,44 ^a
К-А	5,73 ± 1,12 ^a	0,24 ± 0,09 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	3,95 ± 0,45 ^b
А	4,14 ± 1,21 ^a	0,50 ± 0,02 ^b	0,26 ± 0,02 ^b	6,15 ± 0,76 ^c
-А	3,70 ± 1,13 ^b	0,33 ± 0,03 ^c	0,16 ± 0,05 ^c	5,24 ± 0,32 ^a
+А	3,34 ± 1,01 ^b	0,19 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^b	6,07 ± 0,64 ^c
+АА	4,25 ± 0,86 ^a	0,26 ± 0,03 ^a	0,23 ± 0,08 ^b	8,50 ± 0,51 ^c

Показники, які містять однакові літерні індекси статистично не відрізняються; *b* – статистично вірогідна різниця порівняно з показниками з індексом *a* і *c*, $P \leq 0,05$; *c* – статистично вірогідна різниця порівняно з показниками з індексом *a* і *b*, $P \leq 0,05$

вільних жирних кислот і гліцеролу. Гліцерол спрямовується до печінки, використовується як субстрат для глюконеогенезу, тоді як вільні жирні кислоти, окрім пухлинних клітин, використовуються іншими тканинами як альтернативний глюкозі енергетичний субстрат [3]. Про переважне використання жирних кислот як енергетичного субстрату свідчить також і підвищення рівня сироваткових кетонових тіл (табл.), оскільки стану кетозу завжди передують підвищення вмісту неестерифікованих жирних кислот, які вивільняються з триацилгліцеролів адипоцитів в умовах гіпоглікемії [17].

Дефіцит вітаміну А в організмі пухлиноносія супроводжується появою змін у перерозподілі доступних циркулюючих енергетичних субстратів, що в кінцевому разі виявляється в посиленні ознак розвитку пухлинної кахексії. В цій групі (група -А), порівняно з пухлиноносіями з нормальною забезпеченістю вітаміном А, на фоні зниженого рівня глюкози в сироватці крові (показники якого виявляються меншими на 38% порівняно з контрольними групами (групи К і К-А), але статистично не відрізняються від групи пухлиноносіїв із нормальною забезпеченістю вітаміном А (група А), відбувається зниження рівня вільних жирних кислот у 1,5 раза (табл.). Вказана редукція відбувається одночасно зі статистично вірогідним зниженням рівня кетонових тіл у сироватці крові, що свідчить не лише про нижчий рівень доступності цього енергетичного субстрату для нетрансформованих клітин вітаміну А-дефіцитного організму пухлиноносія, але й про сповільнення темпів окислення жирних кислот. Хоча досліджувані показники рівня вільних жирних кислот і кетонових тіл у сироватці крові авітамінозних

щурів із карциномою Герена не досягають показників контрольних груп і виявляються вищими, проте свідчать про відмінності в обміні цих метаболітів, зумовлені відсутністю вітаміну А в організмі з пухлиною. Відомо, що окислення жирних кислот знаходиться під контролем транскрипційних факторів, відомих як рецептори проліфераторів пероксисом (PPAR), функціонування яких відбувається в комплексі із ретиноїд-Х-рецептором (RXR), лігандом якого виступає 9-цис-ретиноева кислота [18]. Відповідно до цього, відсутність вітаміну А ускладнює функціонування цих рецепторних комплексів і регульованих ними метаболічних шляхів, особливо окислення жирних кислот [19–21]. Таким чином, створюється ситуація, коли потреба в енергетичних субстратах як для малігнізованих, так і для нетрансформованих клітин організму пухлиноносія вирішується за рахунок активації альтернативних метаболічних шляхів. Найприйнятнішими субстратами для перетворення в доступні метаболіти енергетичного обміну виявляються лактат, посилене утворення якого відбувається в пухлинних клітинах внаслідок анаеробного гліколізу [3], та вільні амінокислоти, утворені під час протеолізу тканинних протеїнів [12]. При цьому метаболічний шлях циклу Корі в клітинах печінки, основним субстратом якого виступає лактат, зумовлює додатковий енергетичний дефіцит (з огляду на витрату 6 молекул АТФ для синтезу 1 молекули глюкози проти 2 АТФ, утворених за її наступного гліколітичного розщеплення [5]), а найменш енергетично затратним виявляється утворення пірувату з аланіну. Одним із компенсаторних механізмів в умовах нестачі енергетичних субстратів за пухлинного росту є глюконеогенез [22]. Водночас,

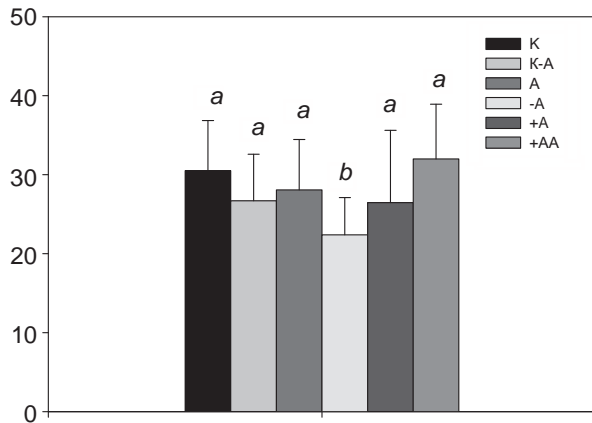


Рис. 3. Рівень альбуміну в сироватці крові щурів із карциною Герена в умовах різної забезпеченості вітаміном А

в авітамінозному організмі цей метаболічний шлях виявляється інгібованим внаслідок зниженої експресії його ключових ензимів, у тому числі фосфоенолпіруват карбоксикінази, експресія якої знаходиться під контролем рівня вітаміну А [23]. Саме неможливістю отримання енергії із основних енергетичних субстратів в авітамінозних тварин зі злякисним новоутворенням внаслідок або виснаження їх запасів (глюкоза), або інгібування їх утилізації (вільні жирні кислоти), єдиним доступним енергетичним субстратом, виявляються амінокислоти, посилене дезамінування яких в нашому експерименті зумовлює зростання негативного азотного балансу (рис. 2). Водночас дефіцит вітаміну А може бути фактором, що підсилює протеїновий катаболізм, зумовлюючи індукцію ензимів циклу сечовини [24].

Про посилення катаболічних процесів в авітамінозному організмі з пухлиною свідчить зниження рівня альбуміну в сироватці крові (рис. 3), а також відносне зниження маси печінки (рис. 1, Б). Поряд із цим, знижений рівень альбуміну може негативно впливати на транспортування жирних кислот [21], обмежуючи їхню доступність нетрансформованим клітинам організму з пухлиною.

Виявлені метаболічні порушення в організмі із карциною Герена в умовах нестачі вітаміну А, виявляються настільки глибокими, що досліджувані показники не повертаються до вихідних значень навіть в

умовах відновлення нормальної забезпеченості вітаміном А.

У разі відновлення вмісту вітаміну А в організмі з використанням його високих доз спостерігається лише часткова нормалізація азотного балансу (рис. 2) поряд із відновленням рівня альбуміну та відносним підвищенням рівня кетонів тіл і загальних ліпідів сироватки крові (табл.).

Отже, нами встановлено, що відсутність вітаміну А в організмі з пухлиною, порівняно з онкогенезом за нормальної забезпеченості цим есенціальним нутрієнтом, супроводжується прискоренням втрати маси тіла та підвищенням негативного азотного балансу на фоні зниженого рівня глюкози, вільних жирних кислот та кетонів тіл у сироватці крові, що свідчить про посилення пухлинної кахексії в авітамінозному організмі зі злякисним новоутворенням.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОЙ КАХЕКСИИ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ А

И. А. Шмарakov, Н. В. Гнеп,
М. М. Марченко

Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича, Украина;
e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

На модели опухолевого роста карциномы Герена и экспериментального моделирования различной обеспеченности витамином А проведены исследования биохимических особенностей опухолевой кахексии у животных. Установлено, что отсутствие витамина А в организме с опухолью, сравнительно с онкогенезом при нормальной обеспеченности этим эссенциальным нутриентом, сопровождается ускорением потери массы тела и повышением негативного азотного баланса на фоне сниженного уровня глюкозы, свободных жирных кислот и кетонных тел в сыворотке крови, что указывает на усиление опухолевой кахексии в авитаминозном организме.

Ключевые слова: витамин А, опухолевый рост, карцинома Герена.

BIOCHEMICAL FEATURES OF CANCER CACHEXIA UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT PROVISION WITH VITAMIN A

*I. O. Shmarakov, N. V. Gnep,
M. M. Marchenko*

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National
University, Ukraine;
e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

S u m m a r y

On the model of tumor growth of Guerin's carcinoma and experimental modeling of vitamin A provision the biochemical characteristics of tumor cachexia in animals with malignant tumors and different vitamin A provision status were studied. It is determined that tumor growth in the body, deprived of vitamin A, is characterized by negative nitrogen balance, decrease of glucose, free fatty acids and ketone bodies level in the blood serum, which indicates the increase of cancer cachexia.

Key words: vitamin A, tumor growth, Guerin's carcinoma.

1. Fearon K. C., Voss A. C., Hustead D. S. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2006. – **83**, N 6. – P. 1345–1350.
2. Inui A. // *Cancer J. Clin.* – 2002. – **52**. – P. 72–91.
3. Esper D. H., Harb W. A. // *Nutr. Clin. Pract.* – 2005. – **20**. – P. 369 – 376.
4. Mantovani G., Maccio A., Gramignano G. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2004. – **13**. – P. 1651–1659.
5. Siddiqui R., Pandya D., Harvey K., Zaloga G. // *Nutr. Clin. Pract.* – 2006. – **21**. – P. 155–167.
6. Марченко М. М., Шмараків І. А., Пасайлюк М. В. // *Вопросы питания.* – 2008. – **77**, № 6. – С. 4–8.
7. Albright C., Salganik R., Dyke T. // *J. Nutrition.* – 2004. – **134**. – P. 1139–1144.
8. McCue P., Thomas R., Schroeder D. et al. // *Cancer Res.* – 1988. – **48**. – P 3772–3779.
9. Pfahl M., Chytil F. // *Ann. Rev. Nutr.* – 1996. – **16**. – P. 257–283.
10. Марченко М. М., Шмараків І. О., Пасайлюк М. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 4. – С. 127.
11. Горячковський О. М. Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. – Одеса: Екологія, 2005. – 616 с.
12. Melstrom L. G., Melstrom K. A., Ding X.-Z., Adrian T. E. // *Histol. Histopathol.* – 2007. – **22**. – P. 805–814.
13. Аничков Н. М. // *Арх. патол.* – 2005. – **67**, № 5. – С. 51–56.
14. Хадышьян Г. Г. // *Онкология и гематология.* – 2007. – № 5. – С. 46–52.
15. Tisdale M. J. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – **2**. – P. 862–871.
16. Мальков О. А., Мороз В. В., Долгих В. Т. // *Общая реаниматология.* – 2008. – **4**. – С. 94–97.
17. Тутов В. Н., Лисицын Д. М. // *Клин. лаб. диагностика.* – 2005. – № 3. – С. 3–9.
18. Shulman A. I., Mangelsdorf D. J. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – **353**. – P. 604–615.
19. Amengual J., Ribot J., Bonet M., Palou A. // *Cell Physiol. Biochem.* – 2010. – **25**, N 6. – P. 657–666.
20. Oliveros L. B., Domeniconi M. A., Vega V. A. et al. // *Br. J. Nutr.* – 2007. – **97**, Issue 02. – P. 263–272.
21. Грызунов Ю. А., Закс И. О., Мороз В. В. и др. // *Анестезиология и реаниматология.* – 2004. – № 6. – С. 68–75.
22. Choi J. H., Park M. J., Kim K. W. // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**. – P. 2795–2801.
23. Shin D.-J., McGrane M. M. // *J. Nutr.* – 1997. – **127**. – P. 1274–1278.
24. Esteban-Pretel G., Marin M. P., Cabezuolo F. V. et al. // *Ibid.* – 2010. – **140**. – P. 792–798.

Отримано 18.02.2011