

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78



Резистентность клеток рака молочной железы к полностью трансретиноевой кислоте ассоциирована со снижением базального уровня экспрессии ядерного рецептора *RARα* и индукции экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, Н.В. Елкина, М.Е. Аксельрод, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Андрей Викторович Комельков komelkov@gmail.com

Введение. Ретиноевая кислота (РК) является одним из ключевых регуляторов дифференцировки клеток и важнейшим участником таких системных процессов в организме, как эмбриональное развитие, созревание и функционирование клеток иммунной системы, ремоделирование тканей и ряд других. Это соединение обладает противоопухолевой активностью благодаря своей способности стимулировать дифференцировку, индуцировать апоптоз и подавлять пролиферацию клеток злокачественных новообразований. Быстрое приобретение резистентности к РК и ее аналогам клетками солидных опухолей является одной из основных проблем, ограничивающих широкое применение естественных и синтетических ретиноидов в терапии злокачественных новообразований. Механизмы развития данной резистентности остаются до сих пор малопонятными.

Цель исследования – оценка связи уровня базальной экспрессии ядерного рецептора *RARα* и РК-индуцированной экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* с резистентностью клеток рака молочной железы к действию полностью трансретиноевой кислоты.

Материалы и методы. Проведены культивирование клеточных линий, анализ чувствительности клеток рака молочной железы к действию полностью трансретиноевой кислоты, выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Результаты. В данной работе с использованием экспериментальной модели, включающей 9 линий клеток рака молочной железы, различающихся по уровню чувствительности к РК, мы показали, что экспрессия матричной РНК гена ядерного рецептора РК, *RARα*, а также уровень индукции матричной РНК генов цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на обработку РК коррелируют с РК-чувствительностью клеток.

Заключение. Таким образом, снижение экспрессии *RARα* и способности катаболизировать РК являются факторами, ассоциированными с РК-резистентностью клеток рака молочной железы.

Ключевые слова: полностью трансретиноевая кислота, рак молочной железы, *RARα*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, резистентность к ретиноевой кислоте

Для цитирования: Еникеев А.Д., Комельков А.В., Елкина Н.В. и др. Резистентность клеток рака молочной железы к полностью трансретиноевой кислоте ассоциирована со снижением базального уровня экспрессии ядерного рецептора *RARα* и индукцией экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2): 66–78. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78.

Resistance of breast cancer cells to all-trans retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor *RARα* expression and induction of cytochrome *CYP26A1* and *CYP26B1* expression

A. D. Enikeev, A. V. Komelkov, N. V. Elkina, M. E. Akselrod, S. A. Kuzmichev, E. M. Tchevkina

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Andrey Viktorovich Komelkov komelkov@gmail.com

Introduction. Retinoic acid (RA) is a key regulator of cell differentiation and a critical player in such systemic processes in the body as embryonic development, immune system cell maturation and functioning, tissue remodeling and several others. This compound displays an antitumor activity due to its ability to stimulate differentiation, induce apoptosis and inhibit proliferation of malignant cells. The rapid acquisition of resistance to RA and its analogues by solid tumor cells is one of the main problems limiting the widespread use of retinoids in the therapy of malignant neoplasms. The mechanisms of RA-resistance are still poorly understood.

The study objective – assessment of the relationship between the basal expression level of the nuclear *RARα* receptor and the RA-induced expression of the cytochromes *CYP26A1* and *CYP26B1* with the resistance of breast cancer cells to the action of all-trans-retinoic acid.

Materials and methods. Cell lines were cultured, the sensitivity of breast cancer cells to the action of fully trans-retinoic acid, RNA isolation, reverse transcription reaction and real-time polymerase chain reaction were analyzed.

Results. In present study, using an experimental model represented by 9 breast cancer cell lines with different level of sensitivity to RA, we showed that the expression of the RA nuclear receptor *RARα*, as well as the level of mRNA induction of *CYP26A1* and *CYP26B1* cytochromes in response to RA treatment correlate with RA-sensitivity.

Conclusion. Thus, a decrease of *RARα* expression as well as the reduced ability to catabolize RA are factors associated with RA-resistance of breast cancer cells.

Key words: all-trans retinoic acid, breast cancer, *RARα*, *CYP26A1*, *CYP26B1*, resistance to retinoic acid

For citation: Enikeev A. D., Komelkov A. V., Elkina N. V. et al. Resistance of breast cancer cells to all-trans retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor *RARα* expression and induction of cytochrome *CYP26A1* and *CYP26B1* expression. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):66–78. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78.

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточная активность ретиноевой кислоты (ПК) реализуется преимущественно за счет активации транскрипции ретиноид-респонсивных генов, к которым относятся регуляторы транспорта и метаболизма ретиноидов, в том числе самой ПК (гены, кодирующие белки катаболизма ретинола (*CRBP1/2*), белки, связывающие ПК в цитоплазме и транспортирующие ее в ядро (*CRABP1/2*), белки катаболизма ПК (цитохромы *CYP26*) и др.), гормоны (например, гормон роста) и ферменты, вовлеченные в синтез стероидных гормонов (например, *EDH17B2*), мембранные рецепторы, различные молекулы, регулирующие состав внеклеточного матрикса (тканевой активатор плазминогена, ламинин В1, β3-интегрин и др.) [1, 2]. Также ПК напрямую или опосредованно изменяет активность ключевых сигнальных путей и белков, задействованных в регуляции канцерогенеза и опухолевой прогрессии, таких как NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell), ИНФγ (интерферон γ), TGFβ (transforming growth factor β), VEGF (vascular endothelial growth factor) [3–5], AP-2 [6], Btg² [7], гены каспаз 7 и 9, а также активирующих их сериновых протеаз [5, 8] и других генов, вовлеченных в индукцию апоптоза. К таким генам относятся *BIRC5* (сурвивин), *Bcl-2* [9, 10], *TRAIL* (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, или Apo-2L), а также *C/EBP* (epsilon) (CCAAT/enhancer binding protein), *UBE1L* (ubiquitin-activating enzyme E1-like protein) и др. Есть данные об ПК-зависимом усилении экспрессии фактора транскрипции *SOX9* и опухолевого супрессора *PDCD4* [11, 12].

Ретиноевая кислота синтезируется в клетке из предшественников ретинола (витамина А) и его эфиров и существует в виде различных изомеров:

13-цис-ПК, 9-цис-ПК и полностью трансретиноевой кислоты (all-trans retinoic acid, ATRA). Последний является максимально представленной в клетке формой ПК и обладает наибольшей транскрипционной активностью [13, 14]. Удаление избытков ПК в клетке осуществляется путем ее катаболизма ферментами семейства P450 системы цитохромов, что приводит к образованию так называемых полярных метаболитов, которые являются физиологически менее активными соединениями. Наибольшей аффинностью к ПК обладают цитохромы *CYP26A1* и *CYP26B1*, которые связывают ATRA и другие изоформы ПК в цитоплазме и катаболизируют ее до 4-ОН-РА, 4-охо-РА и других соединений, защищая клетку от избытка ПК в цитоплазме и препятствуя ее попаданию в ядро [15, 16].

Транспорт ПК в цитоплазме осуществляют белки семейства iLBP (intracellular lipid binding proteins), прежде всего *CRABP1/2* (cellular retinoic acid-binding protein), а также *FABP5* (fatty acid-binding protein), которые доставляют ее в ядро, где она взаимодействует с рецепторами, относящимися к семейству рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов [17]. Ядерные рецепторы ПК представляют собой лиганд-активируемые транскрипционные факторы. Взаимодействие с лигандом приводит к их активации, а также к стимуляции транскрипции генов, в промоторе которых имеются определенные последовательности — ретиноид-респонсивные элементы (retinoic acid response element, RARE). Основными типами рецепторов, связывающих ПК, являются белки *RAR* (retinoic acid receptor), *RXR* (retinoid X receptor), а также *PPAR* (peroxisomal proliferator-activated receptor). Максимально эффективным считается *RARα*, обладающий наибольшей аффинностью к ПК. С рецепторами *RAR* связываются ATRA и 9-цис-ПК. Лигандом *RXR* является 9-цис-ПК.

Экспрессия рецепторов РК регулируется ими самими, что создает петли обратной связи, или другими рецепторами того же семейства, например ER α (estrogen receptor α) [13, 18–20].

Опухоль-супрессорная активность РК показана для многих типов опухолей. Эта кислота не только стимулирует дифференцировку [21–24], но и снижает пролиферативную активность опухолевых клеток [25, 26], активирует процесс апоптоза [27–29], а также подавляет ангиогенез [30, 31]. В клинической практике АТРА наиболее успешно используется в качестве основного препарата при терапии острого промиелоцитарного лейкоза [13, 32–36]. Прошли успешные клинические испытания применения ретиноидов в лечении некоторых форм Т-клеточной лимфомы [37]. Предпринимаются активные попытки использования АТРА и других природных и синтетических ретиноидов в терапии онкологических заболеваний, таких как саркома Капоши [38], плоскоклеточный рак головы и шеи [39], нейробластома [40] и др. [3, 13, 18, 41]. Однако эффективность ретиноидов в терапии большинства солидных опухолей ограничена прежде всего в связи с быстро развивающейся устойчивостью к ним [3, 42, 43].

Механизмы возникновения РК-резистентности до сих пор не до конца понятны. Существует множество гипотез, которые можно условно разделить на несколько основных групп. Согласно первой группе гипотез развитие РК-резистентности связано с ограничением биодоступности ретиноидов, которое происходит из-за снижения метаболизма ретинола, нарушения внутриклеточного транспорта ретинола и ретиноидов (в том числе самой РК), усиления их деградации или удаления из клетки [44]. Устойчивость к РК также может быть вызвана изменением РК-зависимой транскрипции ретиноид-респонсивных генов, которая может реализовываться за счет «эпигенетического молчания» или подавления активности рецепторов РК, RAR α , (возможно, и других) и/или кофакторов, активирующих или подавляющих РК-зависимую транскрипцию, таких как XAB2 [45], ZNF423 [46] или HDAC (вторая группа гипотез) [47]. Согласно гипотезам третьей группы развитие РК-резистентности обусловлено неканонической (негеномной) активностью РК, которая заключается в не зависящей от транскрипции активации белков, играющих ключевую роль в процессах малигнизации клеток. Так, считается, что РК способна регулировать активность MAP-киназ ERK1/2 и p38, а также антиапоптотической киназы АКТ [48, 49], что приводит к усилению злокачественного потенциала клеток и вызывает развитие устойчивости к РК [50–53].

Несмотря на множество гипотез о механизмах формирования РК-резистентности, исследований, в которых бы сравнивались различные факторы, потенциально определяющие устойчивость клеток к РК, в рамках единой экспериментальной модели ранее

не проводилось. Недавно мы показали, что клетки рака молочной железы (РМЖ), в отличие от многих других типов эпителиальных опухолей, характеризуются широким диапазоном РК-чувствительности: от полной резистентности до высокой чувствительности [54]. Это обуславливает перспективность данной экспериментальной модели с точки зрения исследования механизмов РК-резистентности.

В данной работе мы впервые сравнили экспрессию основного ядерного рецептора РК RAR α , а также ферментов катаболизма этой кислоты, CYP26A1 и CYP26B1, в клетках РМЖ с использованием панели из 9 клеточных линий, различающихся по уровню чувствительности к РК. Анализ показал наличие достоверных корреляций уровня РК-чувствительности с экспрессией матричной РНК (мРНК) гена RAR α , а также с уровнем индукции мРНК генов CYP26A1 и CYP26B1 в ответ на инкубацию клеток с АТРА. Таким образом, для клеток РМЖ оба параметра – базальный уровень экспрессии ядерного рецептора РК RAR α и степень активации ферментов катаболизма – являются факторами, ассоциированными с РК-резистентностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В работе были использованы 9 клеточных линий клеток РМЖ. Для культивирования клеток MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100 использовали среду DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) («ПанЭко», Россия), клеток T47D, SKBR3, HCC1954, HCC1937 – среду RPMI («ПанЭко», Россия). Культивирование проводили в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в присутствии глутамина (0,292 мг/мл), смеси пенициллина и стрептомицина (100 ед/мл и 100 мкг/мл соответственно) («ПанЭко», Россия), а также 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, США).

Анализ чувствительности клеток к ретиноевой кислоте. Полностью трансретиноевую кислоту (Merck, США) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для приготовления стокового раствора в концентрации 10 мМ. Клетки высаживали в количестве 50–300 тыс. в зависимости от клеточной линии и культивировали в течение 5 сут в присутствии АТРА в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ.

В связи с тем, что АТРА не является цитотоксическим агентом [55], мы оценивали ее влияние на динамику пролиферации клеток, для чего строили кривые роста и сравнивали количество клеток в «нулевой» точке и после инкубации. Клетки снимали 0,25 % раствором трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты (трипсин-ЭДТА), смешивали с красителем трипановый синий 1 : 1 и подсчитывали с помощью камеры Горяева. В качестве контроля для каждой линии использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде без АТРА, содержащей ДМСО в соответствующей концентрации. Количество живых клеток в контроле для каждой линии принимали

за 100 %. Чувствительность к РК оценивали в 3 повторах для каждого из измерений, соответствующих каждой концентрации АТРА.

Для анализа уровня экспрессии генов в присутствии РК была выбрана концентрация АТРА, равная 1 мкМ, поскольку она была минимально эффективной в отношении влияния РК на пролиферацию клеток (средняя концентрация начала снижения пролиферации различных линий РК-чувствительных клеток). Клетки инкубировали с АТРА в течение 3 сут.

Выделение РНК. После 72 ч культивирования в стандартных условиях и в присутствии АТРА выделяли тотальную РНК из клеток методом тризольно-хлороформной экстракции с использованием TRI Reagent (Merck, США). Клетки снимали с чашки раствором Версена, осаждали центрифугированием (6 мин, 3600 об./мин), отбирали супернатант, к осадку добавляли 1 мл TRI Reagent и 200 мкл хлороформа и инкубировали 15 мин. После этого центрифугировали 15 мин при 13 200 об./мин, отбирали верхнюю фазу и растворяли ее в 200 мкл изопропанола, перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин. Затем центрифугировали 15 мин при 13 200 об./мин, отбирали супернатант, к осадку добавляли 750 мкл этилового спирта. После этого смесь центрифугировали 15 мин при 13 200 об./мин, отбирали супернатант, к осадку добавляли 50 мкл ddH₂O. Очистку РНК от примесей ДНК проводили с помощью фермента DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, США). К 2000 нг РНК добавляли 1 ед ДНКазы и инкубировали 15 мин при 25 °С, фермент инактивировали добавлением 1 мкл 25 мМ EDTA при 65 °С в течение 10 мин.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для получения комплементарной ДНК (кДНК) использовали 2000 нг тотальной РНК и проводили реакцию обратной транскрипции с использованием MMLV-ревертазы (в конечной концентрации 5 ед/мкл), случайного декануклеотидного праймера (20 мкМ) («Евроген», Россия). Реакцию проводили при 37 °С в течение 50 мин.

К 100 нг кДНК добавляли по 500 нМ смеси праймеров (см. таблицу), реакционную смесь для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии SYBR-green («Евроген», Россия) и проводили амплификацию в режиме: 95 °С, 15 с; 57 °С, 15 с; 72 °С, 30 с – 42 цикла. Относительный уровень экспрессии мРНК *RARα* оценивали с помощью расчета dCt для каждой линии. Нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Изменение экспрессии мРНК *CYP26A1*, *CYP26B1* при обработке АТРА вычисляли методом ddCt.

Статистическая обработка данных. Все данные были получены в ходе 3 независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего со стандартным отклонением (SD). Для статистической оценки данных использовали двухвыборочный t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок, крите-

рий Манна–Уитни, анализ дисперсии (ANOVA) для сравнения нескольких групп (с посттестом Даннетта). Для оценки трендов (значимости изменений переменной в ряду) применяли вариант ANOVA с проведением линейного анализа трендов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для проведения расчетов и построения графиков использовали программы GraphPad 8.3 (GraphPad Software, США) и SPSS 26.0 (IBM, США).

Последовательности использованных праймеров для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени

Sequences of primers used in real-time polymerase chain reaction

Ген Gene	Последовательность Sequence
<i>RPL27</i>	Прямой: ACCGCTACCCCGCAAAGTG Forward: ACCGCTACCCCGCAAAGTG Обратный: CCCGTCGGGCGTTGCGTTTA Reverse: CCCGTCGGGCGTTGCGTTTA
<i>RAR</i>	Прямой: GGACATTGACCTCTGGGACA Forward: GGACATTGACCTCTGGGACA Обратный: AAGG TCATGGTGTCTGCTC Reverse: AAGG TCATGGTGTCTGCTC
<i>CYP26A1</i>	Прямой: CCAGAAAGTGCGAGAAGAGC Forward: CCAGAAAGTGCGAGAAGAGC Обратный: GTCTTCAGAGCAACCCGAAA Reverse: GTCTTCAGAGCAACCCGAAA
<i>CYP26B1</i>	Прямой: GCTGCATGATGAGTGAGGGTG Forward: GCTGCATGATGAGTGAGGGTG Обратный: CAGGGCAAGGACTACTTGGGA Reverse: CAGGGCAAGGACTACTTGGGA

РЕЗУЛЬТАТЫ

Корреляция экспрессии ядерного рецептора *RARα* с чувствительностью клеток рака молочной железы к ретиноевой кислоте. Ранее мы показали, что линии клеток РМЖ в значительной степени различаются по уровню чувствительности/резистентности к РК, что позволяет использовать эти клетки в качестве удобной экспериментальной модели для выявления молекулярных характеристик и факторов, связанных с РК-резистентностью. Так, анализ 9 клеточных линий РМЖ показал, что РК оказывает выраженный антипролиферативный эффект на клетки линий MCF7, T47D, SKBR3 и HCC1954. Снижение пролиферации в 2 и более раз наблюдалось при инкубации с АТРА уже в концентрации 0,1–1 мкМ. В то же время пролиферация РК-резистентных клеток (линии MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100, HCC1937) не снижалась даже при инкубации с АТРА в концентрации 10–20 мкМ. Таким образом, выраженные различия между линиями наблюдались в диапазоне 1–10 мкМ.

На основании полученных данных мы разделили исследуемые линии клеток на 2 группы, достоверно различающиеся по уровню пролиферации в присутствии

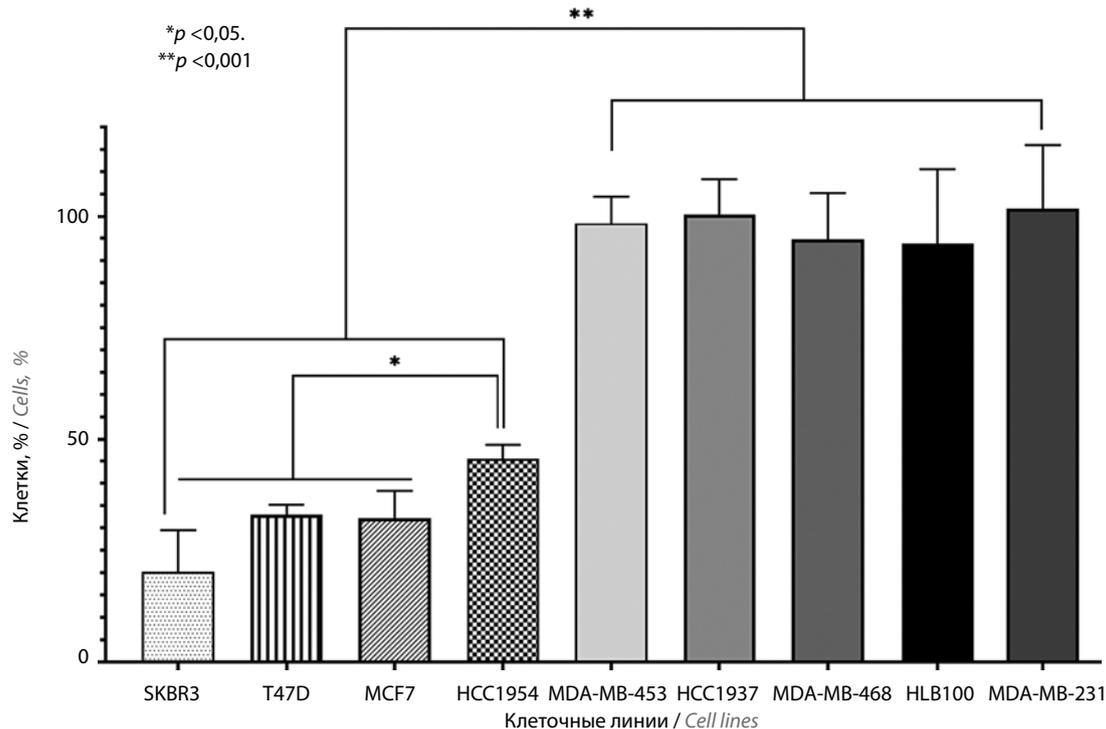


Рис. 1. Сравнение динамики пролиферации клеток рака молочной железы при инкубации с полностью трансретиноевой кислотой (ATRA). Указано количество живых клеток (%) после 5 сут культивирования в присутствии 10 мкМ ATRA по сравнению с контролем. Контроль: за 100 % взято количество живых клеток каждой линии после культивирования в течение того же времени в стандартной среде DMEM с добавлением диметилсульфоксида в концентрациях, соответствующих таковым при разведении ATRA. Диаграммы построены на основании средних значений для 3 независимых повторов эксперимента ($p < 0,001$, дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием посттеста Даннетта)

Fig. 1. Comparing the dynamics of breast cancer cell proliferation during their incubation with all-trans retinoic acid (ATRA). Proportion of viable cells (%) after 5-day cultivation with 10 μM ATRA compared to control. Control: the number of living cells of each line after their cultivation in a standard DMEM medium during the same time with dimethyl sulfoxide added instead of ATRA (same concentration) was considered as 100 %. The diagrams are based on the mean values for 3 independent repeats of the experiment ($p < 0.001$, analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test)

ATRA ($p < 0,001$). В качестве порогового значения была выбрана концентрация 10 мкМ. Сравнение динамики пролиферации клеток РМЖ при инкубации с ATRA представлены на рис. 1. Также важно, что пороговая концентрация ATRA для разделения линий на РК-чувствительные и РК-резистентные выбрана нами произвольно. В действительности клетки можно расположить в некий ряд по чувствительности к РК, на одном конце которого будут максимально чувствительные, а на другом — максимально резистентные линии. Так, в группе РК-резистентных клеток выделяют линии, динамика пролиферации которых не менялась по сравнению с контролем даже при инкубации с 50 мкМ ATRA (HBL100, MDA-MB-231). Среди РК-чувствительных линий HCC1954 характеризовалась наименьшей чувствительностью к РК и даже демонстрировала значимые различия при сравнении с другими линиями данной группы ($p < 0,01$). Тем не менее при использовании концентрации ATRA 10 мкМ клеточные линии хорошо подразделялись на РК-чувствительные и РК-резистентные (см. рис. 1).

Сравнительный анализ экспрессии *RARα*, проведенный методом обратной транскрипции и ПЦП в реальном времени, выявил выраженные и достоверные различия между группой РК-чувствительных и РК-ре-

зистентных клеток ($p < 0,001$) (рис. 2, а). Клетки, чувствительные к РК, характеризовались более высоким уровнем мРНК *RARα* по сравнению с клетками, резистентными к РК. При расчете разницы в экспрессии *RARα* между группами РК-чувствительных и РК-резистентных линий методом ddCt (delta delta Cycle threshold) выявлено снижение экспрессии в группе резистентных клеточных линий в 5,1 раза (рис. 2, б). Показатель ddCt вычисляли путем вычитания из полученных значений dCt для резистентных клеточных линий значений dCt для чувствительных линий. Относительное изменение экспрессии (разы) рассчитывали как 2^{-ddCt} . Самый высокий уровень мРНК *RARα* был детектирован в наиболее чувствительных к РК линиях T47D и SKBR3, а линия HCC1954, в которой отмечено наименьшее снижение среди РК-чувствительных клеток пролиферации при обработке ATRA, характеризовалась значимо меньшим уровнем экспрессии *RARα* по сравнению с другими РК-чувствительными линиями ($p < 0,05$).

Была также подтверждена гипотеза о наличии значимого тренда (линейной зависимости уменьшения экспрессии *RARα* от снижения РК-чувствительности ($p < 0,05$) в группе чувствительных к РК клеточных линий. Таким образом, в данных клеточных линиях

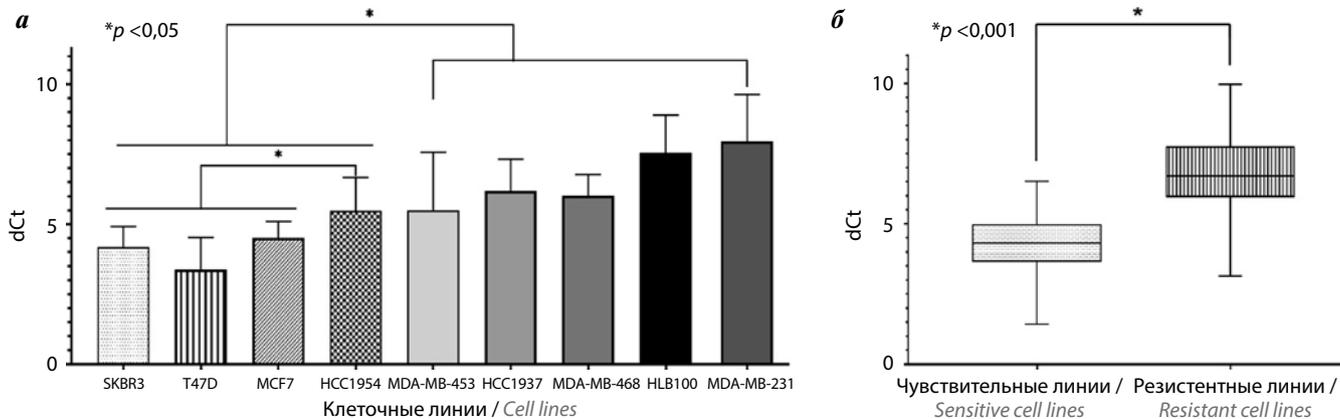


Рис. 2. Анализ экспрессии гена *RARα* в клетках рака молочной железы с различной чувствительностью к ретиноевой кислоте (РК): а – относительная экспрессия *RARα* в линиях РК-чувствительных и РК-резистентных клеток. dCt – разница между Ct *RARα* и Ct референсного гена *RPL27* (внутренний контроль). При увеличении значения dCt экспрессия уменьшается ($p < 0,05$; дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием пост-теста Даннетта); б – сравнение относительной экспрессии гена *RARα* в группах РК-чувствительных и РК-резистентных клеточных линий. Средние значения dCt в данных группах значительно различались ($p < 0,001$; критерий Манна–Уитни)

Рис. 2. Analysis of *RARα* expression in breast cancer cells with different sensitivity to retinoic acid (RA): а – relative *RARα* expression in RA-sensitive and RA-resistant cell lines. dCt – difference between *RARα* Ct and *RPL27* (reference gene) Ct (internal control). Expression decreases as dCt increases ($p < 0,05$; analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test); б – comparison of relative *RARα* expression between RA-sensitive and RA-resistant cell lines. There was a significant difference in mean dCt between these groups ($p < 0,001$; Mann–Whitney U test)

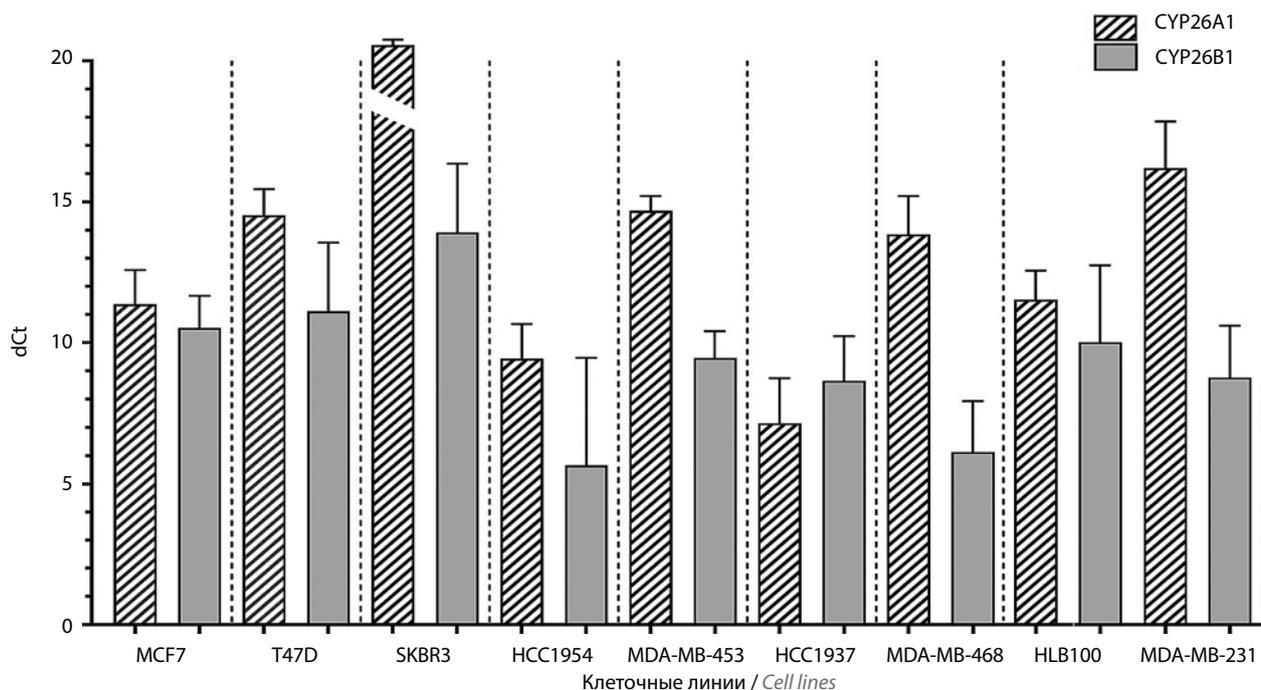


Рис. 3. Соотношение относительной экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* при отсутствии полностью трансретиноевой кислоты в клетках чувствительных и резистентных к ретиноевой кислоте линий. Результаты представлены в виде значений dCt для каждого гена. Разрыв в данных для линии SKBR3 обозначает, что экспрессия *CYP26A1* достоверно не детектировалась

Fig. 3. *CYP26A1/CYP26B1* relative expression ratio in the absence of all-trans retinoic acid in retinoic acid-sensitive and resistant cell lines. Results are shown as dCt values for each gene. A gap in the data for the SKBR3 line indicates that the expression of *CYP26A1* was not reliably detected

экспрессия *RARα* изменялась сонаправленно с уровнем РК-чувствительности.

Обнаруженная нами корреляция уровня мРНК *RARα* с РК-чувствительностью и сонаправленное изменение этих характеристик в ряду исследуемых линий указывает на то, что снижение экспрессии *RARα* происходит параллельно со снижением РК-чувстви-

тельности и может быть одним из механизмов формирования РК-резистентности клеток РМЖ.

Высокий уровень активации экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*, чувствительных к РК клеток, при инкубации с ретиноевой кислотой. Для проверки гипотезы о связи возникновения РК-резистентности с экспрессией основных ферментов, ответственных за деградацию

РК, был проведен анализ уровней мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках рассматриваемой панели линий РМЖ. Результаты анализа базального уровня экспрессии не выявили достоверных различий между группами РК-чувствительных и РК-резистентных линий как для *CYP26A1*, так и для *CYP26B1*. В целом при отсутствии РК экспрессия *CYP26A1* была достаточно низкой, особенно в некоторых РК-чувствительных линиях. А в наиболее чувствительной линии SKBR3 она практически отсутствовала: детекция сигнала происходила уже за пределами диапазона достоверности значений ПЦР-реакции (>40 циклов). Экспрессия *CYP26B1* была выше, чем *CYP26A1*, практически во всех линиях, и это соотношение не было связано с РК-чувствительностью/резистентностью (рис. 3).

Поскольку экспрессия цитохромов индуцируется в ответ на добавление субстрата, далее мы исследовали уровень активации экспрессии генов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на добавление АТРА. Для этого сравнивались уровни мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в стандартных условиях культивации и после инкубации с 1 мкМ АТРА. Данная концентрация АТРА соответствовала началу снижения пролиферации всех РК-чувствительных клеток, но вместе с тем еще не приводила к выраженному подавлению роста максимально РК-чувствительных линий (SKBR3). Таким образом, мы оценивали ранние молекулярные изменения, возникающие под действием АТРА. Результаты рассчитывались по методике ddCt, что соответствует разнице между уровнями мРНК исследуемых генов до и после обработки АТРА. Изменения уровней активации экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на действие АТРА в клетках всех исследуемых линий, выраженные в относительных единицах (разы), по сравнению с экспрессией в отсутствие АТРА, приведены на рис. 4, а и 4, б соответственно.

Согласно данным, представленным на рис. 4, РК-чувствительные линии характеризовались значительно большей индукцией *CYP26A1* по сравнению с группой РК-резистентных линий ($p < 0,001$). Это означает, что клетки, чувствительные к РК, способны эффективнее катаболизировать эту кислоту при увеличении ее внутриклеточной концентрации. В случае *CYP26B1* разница в индукции экспрессии между РК-чувствительными и РК-резистентными линиями была не настолько ярко выражена, как в случае *CYP26A1*, однако тоже была статистически значимой ($p < 0,02$).

Согласно полученным данным РК-резистентные клетки характеризуются, с одной стороны, значимо более низким уровнем экспрессии рецептора *RARα*, что может ограничивать реализацию транскрипционной активности РК, а с другой стороны — меньшим уровнем активации экспрессии цитохромов в ответ на обработку АТРА. Полученные результаты указывают на то, что резистентные клетки защищаются от антипролиферативной опухолесупрессорной активности РК за счет снижения проведения РК-зависимой

внутриклеточной сигнализации (уменьшения экспрессии *RARα*). В то же время они утрачивают способность быстро индуцировать катаболизм РК, что может быть, скорее, результатом, чем причиной РК-резистентности. Иными словами, опухолевые клетки в меньшей степени «опасаются» возрастания концентрации РК и, соответственно, увеличения ее опухолесупрессорной активности, если являются РК-резистентными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ретиновая кислота является наиболее активным внутриклеточным ретиноидом (производным ретинола, витамина А), роль которого в стимуляции дифференцировки и апоптоза, а также в снижении пролиферативной активности показана для многих типов клеток и тканей. Несмотря на очевидный успех применения РК в лечении гематолипролиферативных заболеваний, терапия солидных опухолей на основе ретиноидов в качестве агентов для монотерапии или комбинированной терапии не показала высокой эффективности или обладала кратковременным эффектом. Подробно результаты этих исследований представлены в обзоре R. M. Connolly и др. [3].

Ограничение клинического применения РК в основном связано с быстрым развитием РК-резистентности клеток опухолей. Несмотря на многочисленные исследования, направленные на поиск причин и путей преодоления устойчивости к РК, механизмы ее возникновения до сих пор малопонятны. Это объясняется сложностью многоуровневых взаимодействий в системе внутриклеточного ретинового сигналинга. В процессах поддержания баланса РК внутри клеток задействовано множество белков, осуществляющих внутриклеточный транспорт и метаболизм ретинола и ретиноидов. Процессы, предшествующие образованию РК (ретинол—ретиноаль—РК), обратимы и находятся в динамическом равновесии. Также обратимы и реакции перехода различных стереоизомеров самой РК: 9-цис-РК и 13-цис-РК могут изомеризоваться в АТРА и наоборот, хотя первый процесс встречается чаще, поскольку АТРА, как уже говорилось, является наиболее транскрипционно активным изомером РК [14, 56, 57].

Следующим уровнем регуляции ретинового сигналинга является доставка РК к ядерным рецепторам, которая осуществляется белками CRABP1/2 и FABP4/5. Предполагается, что основным транспортером РК, способствующим проведению ее транскрипционной активности, выступает белок CRABP2. Функции CRABP1 на сегодняшний день не до конца понятны, но, возможно, он удерживает РК в цитоплазме, ограничивая ее попадание в ядро и тем самым препятствуя проведению РК-зависимого сигналинга. Данные некоторых исследований указывают на то, что этот белок способствует активации цитохромов *CYP26* и катаболизму РК [58–62]. Вместе с тем есть свидетельства

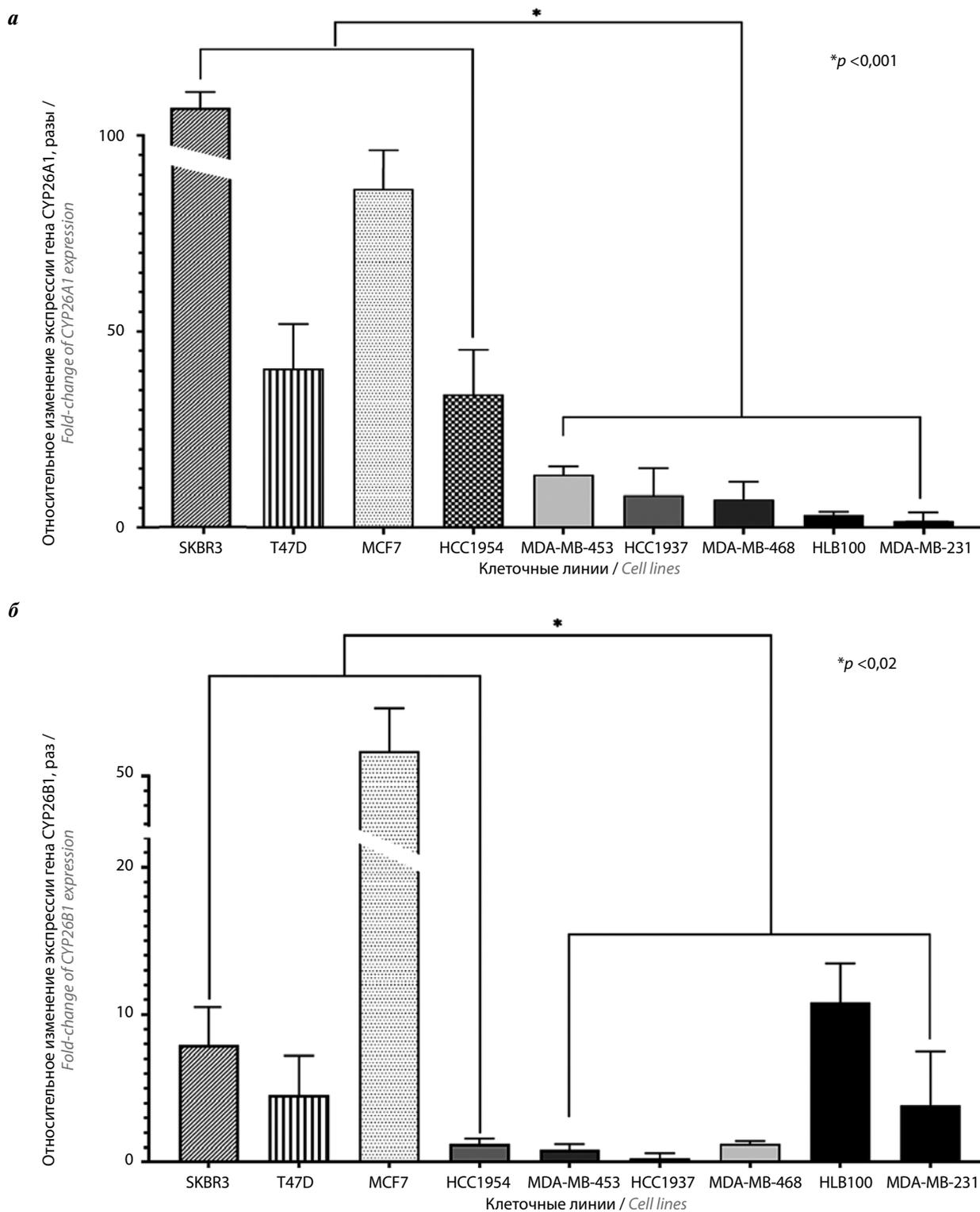


Рис. 4. Относительная экспрессия генов CYP26A1 и CYP26B1 после инкубации с полностью трансретиноевой кислотой (ATRA) в РК-чувствительных и РК-резистентных клеточных линиях: а – относительная экспрессия CYP26A1. Разрыв в данных для линии SKBR3 характеризует ситуацию, когда экспрессия CYP26A1 сильно (более чем в 100 раз) увеличивается после обработки ATRA при отсутствии достоверной детекции экспрессии в стандартных условиях культивации (*p* < 0,001; дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием посттеста Даннетта); б – относительная экспрессия CYP26B1. Разрыв данных для линии MCF7 характеризует ситуацию, когда экспрессия CYP26B1 после обработки ATRA увеличивается сильнее (более чем в 50 раз), чем в остальных линиях (*p* < 0,02; дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием посттеста Даннетта)

Fig. 4. Relative expression of CYP26A1 and CYP26B1 genes in RA-sensitive and RA-resistant cell lines after their incubation with all-trans retinoic acid (ATRA): а – relative CYP26A1 expression. A gap in the data for the SKBR3 line indicates that CYP26A1 expression has dramatically increased (more than 100-fold change) after ATRA treatment, while baseline expression in standard conditions could not be reliably detected (*p* < 0.001; analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test); б – relative expression of CYP26B1. A gap in the data for the MCF7 line indicates that CYP26B1 expression after ATRA treatment has increased more significantly (more than 50-fold change) than in other lines (*p* < 0.02; analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test)

повышения уровня CYP26A1 в ответ на высокие дозы PK при подавлении CRABP1 [63]. В нескольких работах показана возможная связь белка CRABP1 с PK-резистентностью [63, 64], однако эти данные получены на кератиноцитах или клетках плоскоклеточного эпителия. Выявлена роль белка CRABP2 в регуляции PK-чувствительности для клеток PMЖ линии MCF7. Так, гиперэкспрессия CRABP2 усиливала, а подавление экспрессии снижало чувствительность данных клеток к PK [65]. Однако проведенный нами ранее анализ экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 на описанной модели из 9 линий клеток PMЖ не выявил достоверной корреляции с чувствительностью к PK [54].

Белки, связывающие PK, транспортируют ее в ядро, где передают RAR, RXR и PPAR, с помощью которых реализуется транскрипционная активность ретиноевой кислоты [18]. Важно отметить, что PK-связывающие белки обладают избирательностью в отношении доставки PK к определенным рецепторам. Так, предполагается, что CRABP2 транспортирует ее для взаимодействия с RAR и RXR, а FABP4/5 — для связывания с PPAR β/δ . Взаимодействие PK с различными рецепторами приводит, по-видимому, к активации транскрипции разных генов и, даже возможно, к противоположному эффекту в отношении роста и выживания клеток [66].

RAR β считается опухолевым супрессором. Его экспрессия в опухолях часто снижена [67, 68] в связи с метилированием промотора и изменениями структуры хроматина [69]. Эпигенетическое «молчание» данного белка может быть одним из механизмов возникновения PK-резистентности [70]. Важно отметить, что экспрессия RAR β регулируется белком RAR α . Опухоль-супрессорная функция RAR β (подавление пролиферации и стимуляция апоптоза) также, по-видимому, осуществляется с помощью активации RAR α . Так, PK-связанный RAR α взаимодействует с последовательностью RARE в промоторе RAR β , что приводит к активации его транскрипции и последующей трансактивации экспрессии множества генов, задействованных в регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки [3].

Таким образом, ядерные рецепторы RAR могут быть факторами, определяющими PK-чувствительность клеток. Эта гипотеза была проверена в данной работе. Сравнение экспрессии RAR α в PK-чувствительных и PK-резистентных клетках PMЖ показало достоверную корреляцию уровня мРНК данного гена с PK-чувствительностью. Более того, было выявлено, что снижение экспрессии RAR α происходит сонаправленно с уменьшением PK-чувствительности в ряду исследуемых клеточных линий. Полученные нами данные согласуются с результатами работы, выполненной на клетках PMЖ с различным гормон-рецепторным статусом. Авторы показали, что подавление RAR α приводит к снижению PK-чувствительности клеток SKBR3. Также была выявлена коамплифика-

ция RAR α с рецептором ERBB2, что указывает на связь PK-чувствительности с экспрессией как RAR α , так и эстрогеновых рецепторов [71]. Эти же авторы показали, что RAR β играет большую роль в возникновении PK-чувствительности клеток PMЖ HCC1599 и MB-157, которая реализуется, в частности, за счет активации Notch1-зависимого сигнального пути. Было обнаружено, что подавление RAR β приводит к устойчивости данных клеток к действию PK [72].

Есть и другие свидетельства участия рецепторов RAR в развитии PK-чувствительности: так, в PK-резистентных линиях клеток рака пищевода T-1 и T-8 экспрессия генов RAR β подавлена, в то время как PK-чувствительные линии T-2, T-3, T-7, T-12 и T-13 экспрессируют RAR β на высоком уровне [73]. На клетках нейроblastомы — одного из наиболее чувствительных к терапии PK типов солидных опухолей — показано, что проапоптотическая функция PK связана с протеосомной деградацией RAR α , а гиперэкспрессия RAR α в клетках нейроblastомы приводит к повышению их чувствительности к PK [74].

Еще одним регулятором активности PK и потенциальным фактором, вовлеченным в формирование PK-резистентности, является система ее катаболизма, представленная преимущественно цитохромами семейства P450 и белками CYP26. Деградация ATRA осуществляется преимущественно CYP26A1 и CYP26B1, хотя предполагается, что и другие представители данного семейства, такие как CYP3A4 и CYP2C8, могут участвовать в катаболизме ATRA и 13-цис-PK [75]. Хотя исследований, посвященных анализу связи экспрессии белков CYP26 с PK-чувствительностью опухолевых клеток, очень мало, есть гипотеза о том, что усиление катаболизма PK способствует PK-резистентности. На этом основании даже предпринимаются попытки повысить эффективность терапевтического эффекта PK с помощью фармацевтического подавления CYP26 параллельно с назначением ATRA.

В этих целях проводились испытания целого ряда соединений, блокирующих метаболизм PK (retinoic acid metabolism-blocking agents (RAMBAs)) [75, 76]. Однако это не привело к преодолению PK-резистентности, что объясняется рядом причин: разнообразием цитохромов, способных катаболизировать в той или иной степени различные изомеры PK (которые, как уже говорилось, могут переходить друг в друга), а также наличием большого количества петель обратной связи, регулирующих экспрессию ретиноид-реактивных генов (к которым относятся и цитохромы CYP26). Примером такой связи является упомянутое выше возрастание уровня CYP26A1 в ответ на высокие дозы PK при подавлении CRABP1 [63].

Проведенный в данной работе анализ экспрессии CYP26A1 и CYP26B1 не выявил корреляции между уровнями мРНК данных генов в стандартных условиях культивации и чувствительностью клеток к PK. При этом экспрессия CYP26B1 была выше, чем экспрессия

CYP26A1, практически во всех линиях. При добавлении АТРА она возрастала, причем уровень этой индукции, особенно *CYP26A1*, был достоверно выше в РК-чувствительных клеточных линиях. То, что *CYP26B1* продемонстрировал активацию экспрессии в меньшей степени, чем *CYP26A1*, связано, по-видимому, с более высоким базальным уровнем мРНК *CYP26B1*. Неожиданным результатом было то, что РК-чувствительные клетки продемонстрировали больший уровень индукции *CYP26*. Ожидалось, что в резистентных клетках катаболизм РК будет, наоборот, выше, что означало бы, что способность деградировать РК является фактором, способствующим развитию РК-резистентности. Полученные же результаты указывают на то, что РК-резистентные клетки, скорее, утрачивают или снижают способность катаболизировать РК. Однако они согласуются с данными довольно давно опубликованной работы В.Ж.М. Van Der Leede и соавт., которая была выполнена также на клетках РМЖ и показала, что индукция метаболизма РК происходит именно в РК-чувствительных клетках [77].

Согласно нашей гипотезе по мере приобретения РК-резистентного фенотипа утрачивается внутриклеточный баланс РК. Мы предполагаем, что в РК-чувствительных клетках происходит достаточно активный синтез РК из предшественников благодаря активности ферментов метаболизма ретинола и ретиналя. Это более нормальное состояние клеток, при котором факторы синтеза и катаболизма РК сбалансированы – клетки синтезируют ее, проводят РК-зависимую сигнализа-

цию и, в то же время, способны быстро удалить РК в случае ее избытка с помощью активации экспрессии *CYP26*. Резистентные к РК клетки ограничивают проведение ретинового сигналинга с помощью подавления рецепторов RAR и других механизмов, к которым, вероятно, относится и нарушение синтеза РК. Такие клетки «не ожидают» присутствия высокой концентрации РК, и, даже если ее концентрация искусственно повышается, она им «неопасна», т.е. не приводит к снижению пролиферации, как это происходит в случае РК-чувствительных клеток. Поэтому РК-резистентные клетки снижают эффективность системы катаболизма РК, что выражается в уменьшении индукции экспрессии *CYP26* в ответ на искусственное увеличение концентрации РК. Проверка данной гипотезы требует дальнейших исследований, которые будут способствовать пониманию механизмов формирования РК-резистентности и повышению эффективности терапии злокачественных солидных опухолей на основе натуральных и синтетических ретиноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспрессия ядерного рецептора ретиновой кислоты, *RAR α* , а также уровень активации экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на обработку АТРА коррелируют с чувствительностью к РК клеток РМЖ. Полученные данные способствуют лучшему пониманию внутриклеточных механизмов формирования резистентности клеток РМЖ к терапии на основе ретиноидов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rhinn M., Dolle P. Retinoic acid signalling during development. *Development* 2012;139(5):843–58. DOI: 10.1242/dev.065938.
- Theodosiou M., Laudet V., Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cel Mol Life Sci* 2010;67(9):1423–45. DOI: 10.1007/s00018-010-0268-z.
- Connolly R.M., Nguyen N.K., Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1651–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
- Zhang H., Rosdahl I. Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2004;25(2):303–8.
- Mrass P., Rendl M., Mildner M. et al. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 2004;64(18):6542–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1129.
- Lüscher B., Mitchell P.J., Williams T., Tjian R. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev* 1989;3(10):1507–17. DOI: 10.1101/gad.3.10.1507.
- Donato L.J., Suh J.H., Noy N. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: The cell cycle control gene *Btg2* is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* 2007;67(2):609–15. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0989.
- Donato L.J., Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* 2005;65(18):8193–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1177.
- Pratt M.A.C., Niu M., White D. Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. *J Cell Biochem* 2003;90(4):692–708. DOI: 10.1002/jcb.10682.
- Raffo P., Emionite L., Colucci L. et al. Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20(3A):1535–43.
- Afonja O., Raaka B.M., Huang A. et al. RAR agonists stimulate *SOX9* gene expression in breast cancer cell lines: Evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition. *Oncogene* 2002;21(51):7850–60. DOI: 10.1038/sj.onc.1205985.
- Afonja O., Juste D., Das S. et al. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene* 2004;23(49):8135–45. DOI: 10.1038/sj.onc.1207983.
- Bushue N., Wan Y.-J.Y. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv*

- Rev 2010;62(13):1285–98.
DOI: 10.1016/j.addr.2010.07.003.
14. O'Byrne S.M., Blaner W.S. Retinol and retinyl esters: Biochemistry and physiology. *J Lipid Res* 2013;54(7):1731–43.
DOI: 10.1194/jlr.R037648.
 15. Thatcher J.E., Buttrick B., Shaffer S.A. et al. Substrate specificity and ligand interactions of CYP26A1, the human liver retinoic acid hydroxylase. *Mol Pharmacol* 2011;80(2):228–39.
DOI: 10.1124/mol.111.072413.
 16. Steverson F., Jing J., Tripathy S., Isoherranen N. Role of retinoic acid-metabolizing cytochrome P450s, CYP26, in inflammation and cancer. *Adv Pharmacol* 2015;74:373–412.
DOI: 10.1016/bs.apha.2015.04.006.
 17. Tchekina E.M. Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther Oncol Int J* 2017;8(2). Available at: <https://juniperpublishers.com/ctoij/pdf/CTOIJ.MS.ID.555733.pdf>.
 18. Soprano D.R., Qin P., Soprano K.J. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 2004;24(1):201–21.
DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132407.
 19. Ross-Innes C.S., Stark R., Holmes K.A. Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Devel* 2010;24(2):171–82. DOI: 10.1101/gad.552910.
 20. Garattini E., Bolis M., Garattini S.K. et al. Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again. *Cancer Treat Rev* 2014;40(6):739–49.
DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.01.001.
 21. Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980;77(5):2936–40.
DOI: 10.1073/pnas.77.5.2936.
 22. Spinella M.J., Kerley J.S., White K.A., Curtin J.C. Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model. *J Nutr* 2003;133(1):273S–6S.
DOI: 10.1093/jn/133.1.273S.
 23. Huang Y., Boskovic G., Niles R.M. Retinoic acid-induced AP-1 transcriptional activity regulates B16 mouse melanoma growth inhibition and differentiation. *J Cell Physiol* 2003;194(2):162–70.
DOI: 10.1093/jn/133.1.273S.
 24. Gudas L.J., Wagner J.A. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol* 2011;226(2):322–30.
DOI: 10.1002/jcp.22417.
 25. Singh B., Murphy R.F., Ding X.-Z. et al. On the role of transforming growth factor-beta in the growth inhibitory effects of retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2007;6:82.
DOI: 10.1186/1476-4598-6-82.
 26. Wu S., Donigan A., Platsoucas C.D. et al. All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1. *Exp Cell Res* 1997;232(2):277–86.
DOI: 10.1006/excr.1997.3495.
 27. Pfahl M., Piedrafita F.J. Retinoid targets for apoptosis induction. *Oncogene* 2003;22(56):9058–62.
 28. Sadikoglou E., Magoulas G., Theodoropoulou C. et al. Effect of conjugates of all-trans-retinoic acid and shorter polyene chain analogues with amino acids on prostate cancer cell growth. *Eur J Med Chem* 2009;44(8):3175–87.
DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.03.029.
 29. Lee J.H., Yoon J.H., Yu S.J. et al. Retinoic acid and its binding protein modulate apoptotic signals in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010;295(2):229–35.
 30. Kini A.R., Peterson L.A., Tallman M.S., Lingen M.W. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood* 2001;97(12):3919–24.
DOI: 10.1182/blood.v97.12.3919.
 31. Kim M.S., Kim Y.K., Eun H.C. et al. All-trans retinoic acid antagonizes UV-induced VEGF production and angiogenesis via the inhibition of ERK activation in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2006;126(12):2697–706.
DOI: 10.1038/sj.jid.5700463.
 32. Degos L. All-trans-retinoic acid treatment and retinoic acid receptor alpha gene rearrangement in acute promyelocytic leukemia: a model for differentiation therapy. *Int J Cell Cloning* 1992;10(2):63–9.
DOI: 10.1002/stem.5530100202.
 33. Dvorak C.C., Sanders R.P., Dahl G.V.H. et al. Reinduction of relapsed acute promyelocytic leukemia with ATRA and low dose antimetabolite-based chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(5):582–5. DOI: 10.1002/pcb.20592.
 34. Ahmad Tali M., Bashir Y., Bhat S. et al. Pseudotumour cerebri in acute promyelocytic leukemia on treatment with all-trans-retinoic acid (ATRA) – an experience from a tertiary care centre. *Malays J Pathol* 2015;37(2):141–4.
 35. Degos L., Wang Z.Y. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001;20(49):7140–5.
DOI: 10.1038/sj.onc.1204763.
 36. Fenaux P., Wang Z.Z., Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;313:101–28.
DOI: 10.1007/978-3-540-34594-7_7.
 37. Duvic M., Hymes K., Heald P. et al. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous t-cell lymphoma: multinational phase II–III trial results. *J Clin Oncol* 2001;19(9):2456–71.
DOI: 10.1200/JCO.2001.19.9.2456.
 38. Caselli E., Galvan M., Santoni F. et al. Retinoic acid analogues inhibit human herpesvirus 8 replication. *Antivir Ther* 2008;13:199–209.
 39. Khuri F.R., Lippman S.M., Spitz M.R. et al. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer. *J Nat Cancer Ins* 1997;89(3):199–211.
DOI: 10.1093/jnci.199.3.199.
 40. Zuccari G., Carosio R., Fini A. et al. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. *J Control Release* 2005;103(2):369–80. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.12.016.
 41. Garattini E., Gianni M., Terao M. Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. *Curr Pharmaceut Design* 2007;13(13):1375–400.
DOI: 10.2174/138161207780618786.
 42. Lippman S.M., Meyskens F.L.J. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the skin with isotretinoin. *Ann Int Med* 1987;107(4):499–502.
DOI: 10.7326/0003-4819-107-4-499.
 43. Altucci L., Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):81–93.
DOI: 10.1038/35106036.
 44. Chlapek P., Slavikova V., Mazanek P. et al. Why differentiation therapy sometimes fails: Molecular mechanisms of resistance to retinoids. *Int J Mol Sci* 2018;19(1):132.
DOI: 10.3390/ijms19010132.
 45. Ohnuma-Ishikawa K., Morio T. et al. Knockdown of XAB2 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in all-trans retinoic acid-sensitive and -resistant cancer cells. *Cancer Res* 2007;67(3):1019–29.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1638.
 46. Huang S., Laoukili J., Epping M.T. et al. ZNF423 Is Critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome. *Cancer Cell* 2009;15(4):328–40.
DOI: 10.1016/j.ccr.2009.02.023.
 47. Cheung B.B., Tan O., Koach J. et al. Thymosin-β4 is a determinant of drug sensitivity for Fenretinide and Vorinostat combination therapy in neuroblastoma. *Mol Oncol* 2015;9(7):1484–500.
DOI: 10.1016/j.molonc.2015.04.005.
 48. Masiá S., Barettono D., de Lera A.R., Alvarez S. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 2007;1(10):2391–402.
DOI: 10.1210/me.2007-0062.
 49. Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N. et al. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(6):4012–9.
DOI: 10.1074/jbc.M007431200.

50. García-Regalado A., Vargas M., García-Carrancá A. et al. *Mol Cancer* 2013;12:44. DOI: 10.1186/1476-4598-12-44.
51. Quintero Barceinas R.S., García-Regalado A., Aréchaga-Ocampo E. et al. All-trans retinoic acid induces proliferation, survival, and migration in A549 lung Cancer cells by activating the ERK signaling pathway through a transcription-independent mechanism. *BioMed Res Int* 2015;2015:404368. DOI: 10.1155/2015/404368.
52. Еникеев А.Д., Комельков А.В., Зборовская И.Б. и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):127–30. [Enikeev A.D., Komelkov A.V., Zborovskaya I.B. et al. Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin. *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):127–130. (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-127–30. (In Russ.)].
53. Piskunov A., Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. *Oncogene* 2012;31:3333–45.
54. Enikeev A.D., Komelkov A.V., Axelrod M.E. et al. CRABP1 and CRABP2 protein levels do not correlate with the sensitivity of breast cancer cells to retinoic acid, but correlate with each other with CRABP2 being an upstream regulator of CRABP1 production. *Biochemistry* 2021;2(86):259–73. DOI: 10.1134/S0006297921020103.
55. Centritto F., Paroni G., Bolis M. et al. Cellular and molecular determinants of all-trans retinoic acid sensitivity in breast cancer: Luminal phenotype and RAR α expression. *EMBO molecular medicine* 2015;7(7):950–72. DOI: 10.15252/emmm.201404670.
56. Moise A.R., Noy N., Palczewski K., Blaner W.S. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 2007;46(15):4449–58. DOI: 10.1021/bi7003069.
57. Januchowski R., Wójtowicz K., Zabel M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother* 2013;67(7):669–80. DOI: 10.1016/j.biopha.2013.04.005.
58. Boylan J.F., Gudas L.J. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 1992;267(30):21486–91.
59. Fiorella P.D., Napoli J.L. Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J Biol Chem* 1991;266(25):16572–9.
60. Noy N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 2000;348(Pt 3):481–95.
61. Napoli J.L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1999;1440(2–3):139–62. DOI: 10.1016/S1388-1981(99)00117-1.
62. Napoli J., Posch K., Fiorella P., Boerman M. Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of Cellular Retinoid-Binding Protein (CRBP) and Cellular Retinoic Acid-Binding Protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis. *Biomed Pharmacother* 1991;45(4–5):131–43. DOI: 10.1016/0753-3322(91)90101-x.
63. Liu R.Z., Garcia E., Glubrecht D.D. et al. CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: Adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid. *Mol Cancer* 2015;14(1):129. DOI: 10.1186/s12943-015-0380-7.
64. Tang X.-H., Vivero M., Gudas L.J. Overexpression of CRABP1 in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-trans retinoic acid. *Exp Cell Res* 2008;314(1):38–51. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.07.016.
65. Budhu A.S., Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 2002;22(8):2632–41. DOI: 10.1128/MCB.22.8.2632-2641.2002.
66. Schug T.T., Berry D.C., Shaw N.S. et al. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 2007;129(4):723–73. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.050.
67. Widschwendter M., Berger J., Daxenbichler G. et al. Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 1997;57(19):4158–61.
68. Mehrotra J., Vali M., McVeigh M. et al. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. *Clin Cancer Res* 2004;10(9):3104–9. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0118.
69. Sirchia S.M., Ferguson A.T., Sironi E. et al. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene* 2000;19(12):1556–63. DOI: 10.1038/sj.onc.1203456.
70. Sirchia S.M., Ren M., Pili R. et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:2455–61.
71. Paroni G., Fratelli M., Gardini G. et al. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. *Oncogene* 2012;31(29):3431–43. DOI: 10.1038/onc.2011.506.
72. Paroni G., Zanetti A., Barzago M.M. et al. Retinoic acid sensitivity of triple-negative breast cancer cells characterized by constitutive activation of the notch1 pathway: the role of rar β . *Cancers* 2020;12(10):1–23. DOI: 10.3390/cancers12103027.
73. Xu X.C., Liu X., Tahara E. et al. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor- β is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res* 1999;59(10):2477–83.
74. Nagai J.I., Yazawa T., Okudela K. et al. Retinoic acid induces neuroblastoma cell death by inhibiting proteasomal degradation of retinoic acid receptor α . *Cancer Res* 2004;64(21):7910–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1178.
75. Nelson C., Buttrick B., Isoherranen N. Therapeutic potential of the inhibition of the retinoic acid hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by xenobiotics. *Curr Top Med Chem* 2013;13(12):1402–8. DOI: 10.2174/1568026611313120004.
76. Diaz P., Huang W., Keyari C.M., Buttrick B. et al. Development and characterization of novel and selective inhibitors of cytochrome P450 CYP26A1, the human liver retinoic acid hydroxylase. *J Med Chem* 2016;59(6):2579–95. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01780.
77. Van Der Leede B.J.M., Van Den Brink C.E., Pijnappel W.W.M. et al. Autoinduction of retinoic acid metabolism to polar derivatives with decreased biological activity in retinoic acid-sensitive, but not in retinoic acid-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1997;272(29):17921–8. DOI: 10.1074/jbc.272.29.17921.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев: анализ чувствительности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте, анализ экспрессии мРНК CYP26A1, CYP26B1, RAR ;
А.В. Комельков: статистический анализ данных;
Н.В. Елкина: подбор специфических праймеров и оптимизация условий полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени;
М.Е. Аксельрод: работа с культурами клеток;
С.А. Кузьмичев: выделение РНК, анализ литературы по теме статьи;
Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследования, анализ результатов, написание текста статьи.

Authors' contribution

A.D. Enikeev: analysis of cells' sensitivity to retinoic acid, analysis of mRNA expression of CYP26A1, CYP26B1, RAR ;
A.V. Komelkov: statistical data analysis;
N.V. Elkina: selection of specific primers and optimization of conditions of real time RT-PCR;
M.E. Axelrod: working with cell cultures;
S.A. Kuzmichev: RNA isolation, literature analysis on the topic of the article;
E.M. Tchekina: study design, analysis of results, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Д. Еникеев / A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
Н.В. Елкина / N.V. Elkina: <https://orcid.org/0000-0002-0503>
А.В. Комельков / A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
М.Е. Аксельрод / M.E. Axelrod: <https://orcid.org/0000-0003-2778-7870>
С.А. Кузьмичев / S.A. Kuzmichev: <https://orcid.org/0000-0003-1660-0898>
Е.М. Чевкина / E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00027А).
Financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-015-00027A).

Статья поступила: 09.12.2021. **Принята к публикации:** 12.02.2022.

Article submitted: 09.12.2021. **Accepted for publication:** 12.02.2022.