

УДК 577.21

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В БИОСИНТЕЗ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

© 2013 г. Е. С. Кропотова¹, О. Л. Зиновьева¹, А. Ф. Зырянова¹, Е. Л. Чойнзон²,
С. Г. Афанасьев², Н. В. Чердынцева², С. Ф. Берестень¹, Н. Ю. Опарина¹, Т. Д. Машкова^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, 634009

Поступила в редакцию 02.10.2012 г.

Принята к печати 01.11.2012 г.

All-*trans*-ретиновая кислота — основной биологически активный метаболит ретинола (витамина А), необходимый для регуляции эмбриогенеза, тканевой дифференцировки, пролиферации и других процессов. Многочисленные алкоголь-, ретинол- и ретинальдегидрогеназы (ADH, RDH, RALDH), а также альдокеторедуктазы (AKR) катализируют биосинтез ретиновой кислоты. Однако ключевые ферменты, вовлеченные в синтез all-*trans*-ретиновой кислоты во многих нормальных и неопластических тканях, остаются неизвестными. На основе анализа транскриптомных баз данных нами идентифицированы гены, связанные с биосинтезом all-*trans*-ретиновой кислоты и экспрессируемые в образцах нормальных и опухолевых тканей желудка. С использованием полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени определено количественное изменение экспрессии этих генов. Показано значительное снижение уровня мРНК генов, кодирующих ферменты обратимой реакции окисления/восстановления ретинола и ретиналя (*ADH4*, *ADH1B*, *ADH1C*, *RDHL*, *AKR1B10*, *AKR1B1* и *RDH12*), а также необратимой реакции окисления ретиналя (*RALDH1*) в большинстве опухолевых образцов. Резкое понижение экспрессии генов, кодирующих основные ферменты конверсии ретинола и ретиналя в ретиновую кислоту, может привести к значительному снижению содержания all-*trans*-ретиновой кислоты — регулятора транскрипции многих генов, нарушить регуляцию клеточной пролиферации и дифференцировки и иницировать развитие онкологического процесса.

Ключевые слова: all-*trans*-ретиновая кислота, биосинтез ретиновой кислоты, ретинол, ретиналь(дегид), рак желудка, экспрессия генов.

EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN RETINOIC ACID BIOSYNTHESIS IN HUMAN GASTRIC CANCER, by E. S. Kropotova¹, O. L. Zinov'eva¹, A. F. Zyryanova¹, E. L. Choinzonov², S. G. Afans'ev², N. V. Cherdyn'tseva², S. F. Beresten'1, N. Yu. Oparina¹, T. D. Mashkova^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: tamashkova@yandex.ru; ²Tomsk Cancer Research Institute, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634009 Russia). All-*trans*-retinoic acid (ATRA) is the main biologically active metabolite of retinol (vitamin A) that is required for the regulation of such processes as embryogenesis, tissue differentiation, proliferation, and others. Multiple alcohol, retinol and retinaldehyde dehydrogenases (ADHs, RDHs and RALDHs) as well as aldo-keto reductases (AKRs) catalyze the biosynthesis of retinoic acid in humans. For many normal and neoplastic tissues, the key ATRA-synthesizing enzymes remain unknown. We identified ATRA-generating genes that are expressed in normal and malignant gastric tissues using the transcriptomic database analysis. Quantitative changes in the expression levels of these genes in gastric cancer were determined by semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR. Significant decreases in the mRNA levels of genes encoding enzymes that catalyze the reversible oxidation/reduction of retinol and retinaldehyde (*ADH4*, *ADH1B*, *ADH1C*, *RDHL*, *AKR1B10*, *AKR1B1*, and *RDH12*), as well as the oxidation of retinaldehyde (*RALDH1*) were revealed in most of the tumor samples. The sharp reduction in the expression levels of genes encoding the key enzymes that convert retinol and retinaldehyde to retinoic acid could lead to a significant decrease in the content of ATRA — the transcriptional regulator of many genes, which in turn can lead to a dysregulation of cell proliferation/differentiation and initiate cancer development.

Keywords: all-*trans*-retinoic acid, biosynthesis of retinoic acid, retinol, retinal(dehyde), gene expression, gastric cancer.

DOI: 10.7868/S0026898413020079

Принятые сокращения: ADH — алкогольдегидрогеназы; AKR — альдокеторедуктазы; ATRA — all-*trans*-ретиновая кислота; CRBP1 — клеточный ретинол-связывающий белок 1; CYP26A1, B1, C1 — ферменты семейства CYP26 (цитохром P450-зависимые монооксигеназы); RALDH — ретинальдегидрогеназы; RDH — ретинолдегидрогеназы; RefExA — Reference database for gene Expression Analysis; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ОТ-ПЦР — обратная транскрипция с последующей ПЦР; ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени.

* Эл. почта: tamashkova@yandex.ru

Природные и синтетические ретиноиды (производные витамина А — ретинола) занимают значительное место в профилактике и терапии некоторых видов рака. Основной природный биологически активный ретиноид — *all-trans*-ретиноевая кислота (АТРА) — играет очень важную роль в эмбриогенезе, пролиферации, тканевой дифференцировке и канцерогенезе. Биологический эффект АТРА обусловлен ее взаимодействием с белками из семейства ядерных рецепторов ретиноидов (RAR и RXR), в результате которого изменяется регуляция транскрипции различных генов, включая гены, отвечающие за клеточную дифференцировку, пролиферацию и апоптоз. В настоящее время идентифицировано более 500 генов-мишеней, на транскрипцию которых могут влиять рецепторы ретиноидов [1].

Источником ретиноевой кислоты в организме человека служат в основном эфиры ретинола, содержащиеся в животных жирах, и растительные каротиноиды (преимущественно β -каротин), поступающие с пищей. При помощи ретинол-связывающих белков ретинол из главного органа хранения — печени, доставляется кровью к различным тканям, где синтезируется АТРА [2].

Биосинтез АТРА — сложный процесс, в котором участвует большое количество ферментов [3, 4]. Он включает обратимую реакцию окисления *all-trans*-ретинола в *all-trans*-ретиноальдегид (*all-trans*-ретиноаль) с последующим его окислением в ретиноевую кислоту. АТРА-синтезирующие ферменты различаются по каталитической активности, тканевой и субстратной специфичности. В окислении ретинола в ретиноаль участвуют как цитозольные алкогольдегидрогеназы (ADH), так и митохондриальные NAD^+ -зависимые ретинолдегидрогеназы (RDH). ADH могут окислять спирты, включая этанол и ретинол, а также восстанавливать различные альдегиды, но значительно большую активность они проявляют в реакции окисления. У человека в настоящее время идентифицированы семь генов, локализованных на небольшом участке хромосомы 4q21–23 и кодирующих ADH, которые объединены в пять классов (I–V): ADH1 (класс I, ADH1A, ADH1B и ADH1C), ADH 2 (класс II), ADH3 (класс III), ADH4 (класс IV), ADH6 (класс V) [5, 6]. ADH1, ADH3 и ADH4 могут участвовать в биосинтезе АТРА *in vivo* [4, 7, 8]. ADH1, ADH2 и, особенно, ADH4 очень активно окисляют ретинол [9, 10] в отличие от ADH3, которая имеет весьма низкую активность [8].

Из NAD^+ -зависимых RDH человека [10–12] к наиболее активным ретинол-окисляющим относятся *all-trans*-ретинол-специфичные RDH10 [13] и RoDH4 [9]. В реакции восстановления ретинола в ретинол участвуют NADP^+ -зависимые RDH, альдокеторедуктазы (AKR), а также ADH, хотя их эффективность меньше, чем в реакции окисле-

ния ретинола. Из NADP^+ -зависимых RDH каталитически наиболее активны RDH12 и RDH11 [10, 14]. AKR только в последнее время стали рассматривать как высокоэффективные ретинол-восстанавливающие ферменты. Наибольший интерес представляют две AKR человека, принадлежащие к семейству AKR1B альдозоредуктаз — AKR1B1 и AKR1B10 [9, 15]. В организме человека окисление ретинола в АТРА катализируется ретиноид-активными RALDH1 (ALDH1A1), RALDH2 (ALDH1A2) и RALDH3 (ALDH1A3). В биосинтезе АТРА у мышей участвуют ортологичные ферменты Raldh1, -2 и -3 [4]. Количество АТРА регулируется как АТРА-синтезирующими ферментами, так и специфичными для человека АТРА-деградирующими цитохромами CYP26A1, CYP26B1 и CYP26C1 [16].

Нарушение конверсии ретинола в АТРА наблюдали при нескольких типах рака, включая колоректальный рак [17], рак предстательной [18] и молочной железы [19], яичников [20] и желудка [21]. Рак желудка относится к наиболее распространенным в России и во всем мире видам рака [22, 23]. Для поддержания нормальной морфологии слизистой оболочки желудка [21] необходима АТРА, которая образуется из *all-trans*-ретинола [24]. Риск развития рака желудка повышен у лиц с низким уровнем предшественников ретинола (α - и β -каротина) в крови [25], в то время как высокие дозы провитамина и витамина А могут снизить риск этого заболевания [26].

В биосинтезе АТРА в разных тканях участвуют различные наборы ферментов, состав которых во многих тканях, включая нормальную слизистую оболочку и опухолевые ткани желудка, еще не установлен. Цель настоящей работы — идентификация биоинформатическими методами генов, кодирующих ферменты, активные в тканях желудка, а также изучение экспрессии этих генов в нормальных тканях и в злокачественных опухолях желудка при помощи полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клинические образцы. Анализировали 38 пар (опухоль и норма) послеоперационных образцов, полученных от больных раком желудка (25 мужчин (65.8%) и 13 женщин (34.2%) в возрасте 27–82 года, средний возраст 56 лет). Доля лиц старше 50 лет — 68.4%. Нормой считали гистологически нормальные ткани, смежные с опухолью. Образцы получены из коллекции клиники Томского НИИ онкологии СО РАМН. После операции образцы немедленно замораживали при -70°C и хранили в этих условиях до использования.

Все образцы опухолей охарактеризованы согласно международной системе клинко-морфо-

логической классификации опухолей TNM. У пятерых больных установлена стадия I заболевания, II – у 10, III – у 15, IV – у восьми. У 22 больных обнаружены метастазы в регионарные лимфатические узлы. Умеренная степень дифференцировки ткани опухоли выявлена у 11 человек, низкая (включая слизистые) – у 24 и смешанная – у трех. При помощи гистологического анализа отобраны образцы, содержащие не менее 80% неопластических клеток. Сбор образцов проводили в соответствии с протоколом, утвержденным специализированным советом.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с “Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан”, получено разрешение этического комитета НИИ онкологии СО РАМН и информированное согласие больных.

Анализ транскриптомных баз данных гибридизации на микропанелях (RefExA и ONCOMINE). Уровень экспрессии генов, потенциально участвующих в биосинтезе АТРА в нормальном эпителии желудка, оценивали с использованием стандартизированной базы данных RefExA (Reference database for gene Expression Analysis, http://157.82.78.238/refexa/main_search.jsp), содержащей результаты гибридизации кДНК, полученных из различных нормальных тканей, для микропанелей Affymetrix (HG-U133A и HG-133B). Дифференциальную экспрессию генов при аденокарциноме желудка оценивали с использованием базы данных ONCOMINE (<http://www.oncomine.org>).

Выделение РНК из образцов тканей и синтез первой цепи кДНК. Суммарную РНК выделяли из замороженных, измельченных в жидком азоте образцов опухолевых и нормальных тканей желудка. Образцы тканей гомогенизировали на приборе Micro-Dismembrator U (“Sartorius”). РНК выделяли при помощи набора RNeasy Mini kit (“Qiagen”) согласно протоколам фирмы, добавив обработку ДНКазой I. Качество препарата РНК проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромида этидия. Количество РНК определяли на спектрофотометре ND 1000 (“NanoDrop Technologies, Inc”). На матрице РНК синтезировали одноцепочечную кДНК. Для получения кДНК использовали 1 мкг суммарной РНК, обратную транскриптазу SuperScript™ III (“Invitrogen”) и случайные гексануклеотидные праймеры (“Синтол”, Москва).

Полуколичественная ОТ-ПЦР. Уровень мРНК генов, кодирующих АТРА-синтезирующие ферменты, определяли предварительно при помощи ОТ-ПЦР. Праймеры подбирали к разным экзонам генов так, чтобы один из праймеров перекрывал границу между экзонами. В этом случае примеси геномной ДНК не влияют на результаты

амплификации. В качестве контрольного гена выбран ген β-актина (*ACTB*), уровень экспрессии которого стабилен как в нормальной слизистой оболочке желудка, так и в опухолях желудка.

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей: 67 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween-20, 2.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTP, 0.1–0.01 мкг кДНК, 0.4 мкМ каждого из праймеров, 2 ед. акт. SmarTaq-ДНК-полимеразы (“Диалат ЛТД”, Москва). Условия амплификации: предварительный прогрев – 94°C, 3 мин; 25–40 циклов (в зависимости от гена) – 94°C, 30 с, 60°C, 30 с и 72°C, 30 с; 1 цикл – 72°C, 5 мин. ПЦР проводили на амплификаторе MasterCycler (“Eppendorf”). Продукты амплификации анализировали в 1.8%-ном агарозном геле с 0.5 мкг/мл бромида этидия. Все реакции амплификации повторяли трижды. В результате подобрали оптимальные условия ОТ-ПЦР, при которых получили линейную зависимость между количеством ПЦР-продукта и числом циклов.

Интенсивность флуоресценции полос после электрофоретического разделения продуктов ПЦР оценивали количественно при помощи программы для денситометрии фотографий GeneProfiler (<http://www.scanalytics.com>), нормировали относительно контрольного гена и выражали в виде значений относительной интенсивности норма/опухоль (N/T).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Количественные изменения содержания мРНК АТРА-ассоциированных генов анализировали в 38 парных образцах (опухоль и прилежащие гистологически нормальные ткани) методом ПЦР-РВ на амплификаторе Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. В качестве контрольного гена использовали ген *ACTB*. Реакции проводили в объеме 25 мкл в стандартных 96-луночных оптических плашках (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate) в трех повторностях. Реакционная смесь содержала интеркалирующий краситель EvaGreen™ (“Biotium, Inc.”), праймеры, матрицу (кДНК), пассивный краситель ROX, термостабильную реакционную смесь Riality™ [28], содержащую Taq-ДНК-полимеразу, dNTP, MgCl₂, ПЦР-буфер. Интеркалирующая краска нового поколения EvaGreen ингибирует ПЦР в значительно меньшей степени, чем широко используемые краски SYBR Green, более стабильна и не обладает мутагенным действием. Для всех генов, кроме *RDH10*, использовали те же праймеры, что и при ОТ-ПЦР – *RDH10*, *F2* и *RDH10*, *R2*. Каждая плашка содержала три отрицательных контроля (образцы без кДНК). Температурный профиль реакции: 95°C, 10 мин; 40 циклов – 95°C, 15 с; 60°C, 1 мин. Специфичность продуктов ПЦР проверяли методом кривой плавления и электрофоретическим разделением в 1.8%-ном агароз-

Таблица 1. Изменение уровня экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез АТРА, при раке желудка (данные биоинформатического анализа)

Символ гена		Уровень экспрессии генов в нормальных тканях (RefExA), отн. ед.**	Изменение уровня экспрессии генов в опухолевых тканях (ONCOMINE)***
общепринятый*	номенклатурный		
<i>ADH1A</i> (класс I)	<i>ADH1A</i>	44	-2.39↓ (0.01)
<i>ADH1B</i> (класс I)	<i>ADH1B</i>	296	-4.34↓ (7.40E-18)
<i>ADH1C</i> (класс I)	<i>ADH1C</i>	312	-8.7↓ (1.80E-06)
<i>ADH2</i> (класс II)	<i>ADH4</i>	4	-2.15↓ (0.01)
<i>ADH3</i> (класс III)	<i>ADH5</i>	303	Нет изменения
<i>ADH4</i> (класс IV)	<i>ADH7</i>	136	-5.9↓ (8.05E-12)
<i>RDH10</i>	<i>RDH10</i>	170	2.19↑ (5.70E-04)
<i>RDHL</i>	<i>DHRS9</i>	65	-3.99↓ (1.26E-04)
<i>RDH5</i>	<i>RDH5</i>	15	Нет изменения
<i>RoDH4</i>	<i>RDH16</i>	7	Нет изменения
<i>RDH11</i>	<i>RDH11</i>	54	Нет изменения
<i>RDH12</i>	<i>RDH12</i>	139	-7.8↓ (1.29E-11)
<i>AKR1B1</i>	<i>AKR1B1</i>	404	Нет изменения
<i>AKR1B10</i>	<i>AKR1B10</i>	3021	-8.15↓ (4.58E-08)
<i>RALDH1</i>	<i>ALDH1A1</i>	1352	-2.36↓ (4.43E-05)
<i>RALDH2</i>	<i>ALDH1A2</i>	10	Нет изменения
<i>RALDH3</i>	<i>ALDH1A3</i>	65	2.34↑ (3.10E-05)
<i>CYP26A1</i>	<i>CYP26A1</i>	34	Нет изменения
<i>CRBP1</i>	<i>RBP1</i>	70	Нет изменения

* Используются общепринятые, наиболее распространенные символы генов.

** Уровень экспрессии определяли по интенсивности сигнала гибридизации (отн. ед.).

*** Измеряли кратность изменений (разы) экспрессии в парах норма/опухоль, ↓ – понижение и ↑ – повышение уровня экспрессии. В скобках приведены значения *p*.

ном геле. Относительный количественный анализ проводили с использованием программы Lin-RegPCR (12.0).

Статистический анализ. Статистическую значимость изменений уровня мРНК анализируемых генов оценивали с использованием непараметрического теста Уилкоксона. Результаты считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация генов, потенциально вовлеченных в биосинтез АТРА в нормальных и опухолевых тканях желудка, при помощи анализа транскриптомных баз данных RefExA и ONCOMINE

В результате анализа опубликованных данных мы отобрали гены, которые участвуют в биосинтезе АТРА и экспрессируются тканеспецифично. Первоначально получили набор из 32 генов, который включал семь генов АДН (*ADH1A*, *-B* и *-C*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH6*), 16 RDH (*RDH10*, *RDHL*, *RDH5*, *RoDH*, *RoDH4*, *RDHE2*, *XOR*, *RDH8*,

RDH11-14, *RDH17*, *DHRS4*, *DHRS4L2*, *SDRO*), два гена АКР (*AKR1B1* и *-B10*), три RALDH (*RALDH1*, *-2* и *-3*), три CYP26 (*CYP26A1*, *-B1* и *-C1*), а также ген, кодирующий клеточный ретинол-связывающий белок 1 (*CRBP1*). Для идентификации потенциальных генов, вовлеченных в биосинтез АТРА в нормальной слизистой оболочке и в опухолевых тканях желудка, мы обработали результаты анализа массива данных (микроэрей-анализа), представленных в транскриптомных базах RefExA и ONCOMINE. В нормальной слизистой оболочке желудка обнаружены мРНК только 11 АТРА-синтезирующих генов, представляющих интерес для дальнейшего изучения (RefExA), восемь из них поразному экспрессировались в опухолевых и нормальных образцах (ONCOMINE) (табл. 1).

В нормальной слизистой желудка ретинол-окисляющая стадия биосинтеза АТРА ассоциирована в основном с экспрессией генов *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH3* и *ADH4*. Содержание мРНК генов *ADH1B*, *ADH1C* и *ADH4* в опухолевых образцах резко снижено, в отличие от гена *ADH3*, уровень мРНК которого не изменяется. Согласно данным

RefExA в нормальной слизистой желудка мРНК *ADH1A* и *ADH6* находятся на относительно более низком уровне, а мРНК *ADH2* – на очень низком.

В нормальной слизистой оболочке желудка уровень мРНК генов, кодирующих ретинол-окисляющие RDH: *RDH10* и *RDHL*, был достаточно высоким. В опухолевых образцах экспрессия гена *RDHL* была снижена, а *RDH10* незначительно повышена (приблизительно в 2 раза).

Из мРНК, кодирующих ретиналь-восстанавливающие ферменты, в нормальных тканях желудка обнаружены *RDH11*, *RDH12*, *AKR1B1* и *AKR1B10*. Наибольший гибридационный сигнал соответствовал гену *AKR1B10*. Содержание мРНК *RDH12* и *AKR1B10* резко снижалось в опухолевых образцах, а уровень мРНК *RDH11* и *AKR1B1* оставался неизменным. Из мРНК ретиналь-окисляющих ферментов на высоком уровне в нормальных тканях обнаружена только мРНК *RALDH1*, в опухолях ее содержание уменьшено.

Одновременное использование двух разных транскриптомных баз данных позволило нам идентифицировать панель генов, потенциально вовлеченных в биосинтез белка в нормальных и опухолевых тканях желудка, и установить тенденции изменения экспрессии этих генов при раке желудка. Результаты биоинформатического транскриптомного анализа мы подтвердили при помощи полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ. Для экспериментальной проверки были отобраны гены, которые экспрессируются в нормальных и/или опухолевых тканях желудка на высоком и среднем уровне (*ADH1B*, *ADH1C*, *ADH3*, *ADH4*, *RDH10*, *RDHL*, *RDH11*, *RDH12*, *AKR1B1*, *AKR1B10* и *RALDH1*). Этот набор мы расширили, добавив гены, которые, по данным биоинформатического анализа, экспрессируются на невысоком уровне или вообще не экспрессируются (*ADH1A*, *ADH2*, *RoDH4*, *RALDH2*, *RALDH3* и *CYP26A1*), но кодируют высокоактивные ретиноид-ассоциированные ферменты или белки, ассоциированные с опухолями желудочно-кишечного тракта (*RDH5*). Мы также анализировали экспрессию гена *CRBP1*, играющего важную роль в биосинтезе АТРА.

Изменение экспрессии генов, кодирующих ретинол-окисляющие ферменты

Уровень мРНК 19 генов (*ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *RDH10*, *RoDH4*, *RDHL*, *RDH5*, *RDH11*, *RDH12*, *AKR1B1*, *AKR1B10*, *RALDH1*, *RALDH2*, *RALDH3*, *CYP26A1* и *CRBP1*), потенциально вовлеченных в биосинтез АТРА, определяли при помощи полуколичественной ОТ-ПЦР в 30 парах образцов (опухоль/норма), полученных от больных раком желудка. Нуклеотидные последовательности праймеров ко всем анализируемым генам приведены в табл. 2. В нор-

мальной слизистой оболочке желудка из генов, кодирующих ретинол-окисляющие ферменты, экспрессируются *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH4*, *ADH3*, *RDH10*, *RDHL* и *RDH5* (рис. 1). Уровень их мРНК в норме понижается в ряду $ADH1B = ADH1C > RDH10 \geq ADH4 > ADH3 > RDHL > RDH5$. мРНК *ADH1A*, *ADH2* и *RoDH4* не выявлены ни в нормальных, ни в опухолевых тканях желудка.

Результаты анализа изменения уровня мРНК этих генов при помощи ОТ-ПЦР в образцах рака желудка представлены на рис. 1 и в табл. 3. Содержание мРНК *RDH10*, *ADH3* и *RDH5* в большинстве опухолевых образцов практически такое же, как в нормальной ткани (77, 67 и 53% соответственно). Уровень мРНК *RDHL* снижен в 60% опухолевых образцов. Наиболее существенно изменяется экспрессия генов *ADH4*, *ADH1B* и *ADH1C*. По данным ПЦР-РВ этих генов, проведенной на расширенной панели образцов (38 пар), резкое снижение содержания мРНК – в среднем в 31, 15 и 23 раза, выявлено в 84, 53 и 58% опухолевых образцов, соответственно (табл. 3), причем в 92% образцов значительно снижен уровень экспрессии хотя бы одного из этих генов (рис. 2а). Следует отметить, что содержание мРНК этих генов существенно снижено уже на ранних стадиях рака желудка. Таким образом, в большинстве опухолевых образцов нами выявлено резкое снижение уровня мРНК всех наиболее активно экспрессирующихся в нормальных тканях желудка генов, кодирующих ферменты окисления ретинола в ретиналь.

Изменение экспрессии генов, кодирующих ретиналь-восстанавливающие ферменты

В реакции восстановления ретиналя в ретиналь в тканях желудка участвуют NADP⁺-зависимые RDH (*RDH12* и *RDH11*), AKR (*AKR1B10* и *AKR1B1*), а также ADH (*ADH4*, *ADH1B* и *ADH1C*), хотя их активность значительно ниже, чем в реакции окисления ретинола. Уровень мРНК генов этих ферментов в норме понижается в ряду $AKR1B10 > ADH1B = ADH1C > ADH4 = RDH12 = RDH11 > AKR1B1$. Содержание мРНК *AKR1B1* снижено в 53% опухолевых образцов, в то время как мРНК *RDH11* – только в 33% и не изменено в 44% образцов. Наиболее заметно изменяется экспрессия генов *AKR1B10* и *RDH12*. При помощи ПЦР-РВ, проведенной на расширенной панели образцов, показано резкое снижение содержания мРНК этих генов – в среднем в 20 и 23 раза в 74 и 90% опухолевых образцов, соответственно (табл. 3 и рис. 2), причем экспрессия существенно изменялась уже на ранних стадиях образования опухоли. Следует отметить, что в 92% образцов значительно снижался уровень экспрессии хотя бы одного из двух генов (*AKR1B10*, *RDH12*), а в 100% – одного из трех генов, кодирующих наибо-

Таблица 2. Праймеры для ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров (5' → 3')	Продукт ПЦР, п.н.	NCBI Refseq mRNA ID
<i>ADH1A</i>	F GGGTGA CTACAGTCAA ACCAGGTGA R GGTCCCCTGAGGATTGCTTACATCG	131	<i>NM_000667.3</i>
<i>ADH1B</i>	F TGGCACCAGCACCTTCTCCC R GAGCCTGGGGTGACCTTGGC	156	<i>NM_000668.4</i>
<i>ADH1C</i>	F AGACAGAATCAATATGAGCACAGCAGG R ACCAGGTTGCCACTAACCACATGC	190	<i>NM_000669.3</i>
<i>ADH2</i>	F TGCAATCAACAATGCCAAGGTCACCC R CAGTCAGTGGCTCCCAGGGC	174	<i>NM_000670.3</i>
<i>ADH3</i>	F GCTGGTGCTTCCCGGATCATTGG R GCCTCAAGTGCTGCTCTCATGACC	203	<i>NM_000671.3</i>
<i>ADH4</i>	F GACCAGCGTGGTTGTAGGAGTTCC R TCCATGTGCGTCCAGTGAAGAGC	83	<i>NM_001166504.1</i>
<i>RDH10</i>	F1 GCCATGCACACTTCTGGACCACT R1 ACTCCGGCAGTACTGAACAATCCCA	112 (1)	<i>NM_172037.3</i>
	F2 AATAATGCTGGTGTGGTCTCTGG R2 CTGGCACAGTAATCCTCAACTCC	209 (2)	
<i>RDHL</i>	F TGGAAACTTGGCAGCCAGAA R CCAGAGACCTTTCTCCCAA	199	<i>NM_001142271.1</i>
<i>RDH5</i>	F TTCTCTGACAGCCTGAGGCG R TGCCTGTGTCATTTTCAGG	202	<i>NM_001199771.1</i>
<i>RoDH4</i>	F GACCGGTCCAGTCCAGAGGTC R TAGCGAGTACGGGGGTGGCAG	161	<i>NM_003708.3</i>
<i>RDH11</i>	F CACTTGGGTCACTTCCTCCTAAC R AACGCCAGAGCCTTTTAGTCTC	228	<i>NM_016026.3</i>
<i>RDH12</i>	F TGGAACGATGCTGGTCACCTTGG R GATCACCCTACCTTGCCAGGAAGC	139	<i>NM_152443.2</i>
<i>AKR1B1</i>	F TGGATGAAGGGCTGGTGAA R GGTGGCACTCAATCTGGTTA	121	<i>NM_001628.2</i>
<i>AKR1B10</i>	F GGACCTGTTCATCGTCAGCAA R CCCAGACTTGAATCCCTGTG	145	<i>NM_020299.4</i>
<i>RALDH1</i>	F AACTCCTCTCACTGCTCTCCACG R GTCACCCTCTCAGATTGCTTTTCC	210	<i>NM_000689.4</i>
<i>RALDH2</i>	F CAAGATGTCTGGAATGGGAGAG R CTTAAGTAAGGACCGTGGCTCA	210	<i>NM_001206897.1</i>
<i>RALDH3</i>	F TCAACTGCTACAACGCCCTCTAT R CGCCGTCCGATGTTTGAG	184	<i>NM_000693.2</i>
<i>CYP26A1</i>	F GCTGTACCGGGGCATGAAGGC R CAGCCGCTCTCCCCTCTCC	130	<i>NM_057157.2</i>
<i>CRBP1</i>	F TAGAGATGAGAGTGGAAGGTGTGGT R GGGGTGGCTGGACATTTTGG	153	<i>NM_002899.3</i>
<i>ACTB</i>	F CCTTCCTGGGCATGGAGTC R CTTGATCTTCATTGTGCTGGGT	191	<i>NM_001101.3</i>

Примечание. Праймеры *RDH10*, *F1* и *RDH10*, *R1* использовали при проведении ОТ-ПЦР, а праймеры *RDH10*, *F2* и *RDH10*, *R2* – при проведении ПЦР-РВ.

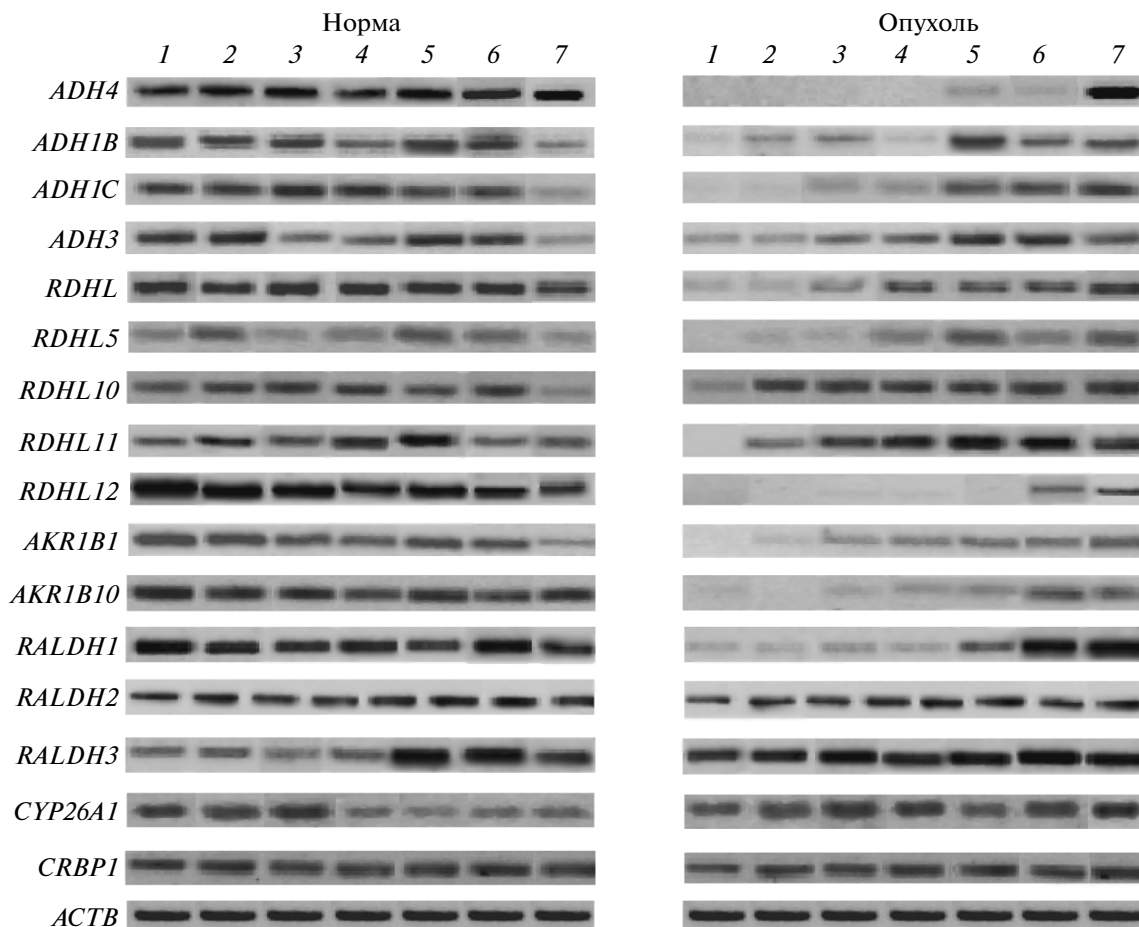


Рис. 1. ОТ-ПЦР-анализ изменения уровня мРНК генов, вовлеченных в биосинтез АТРА, при раке желудка по сравнению со смежными нормальными тканями. *RALDH1* и *AKR1B10* – после 28 циклов; *ADH1C*, *ADH1B* – 30 циклов; *ADH4*, *RDH10*, *RDH11*, *RDH12* – 32 цикла, *ADH4* и *AKR1B1* – 33 цикла; *RDHL* и *RALDH3* – 34 цикла; *RDH5* и *CRBP1* – 35 циклов; *RALDH2* – 36 циклов и *CYP26A1* – 39 циклов. Ген β-актина (*ACTB*) (28 циклов) использован в качестве внутреннего контроля. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации каждого гена проводили в 1.8%-ном агарозном геле.

более активные ретиналь-восстанавливающие ферменты (*AKR1B10*, *RDH12*, *ADH4*) (рис. 2).

Таким образом, в большинстве опухолевых образцов значительно снижен уровень мРНК всех наиболее активно экспрессирующихся в нормальных тканях желудка генов, кодирующих ферменты восстановления ретиналя в ретинол.

Экспрессия генов, кодирующих ретиналь-окисляющие ферменты *RALDH1*, -2 и -3, АТРА-деградирующий *CYP26A1* и *CRBP1*

В реакции окисления ретиналя в ретиноевую кислоту могут участвовать три *RALDH* (-1, -2 и -3). В нормальной слизистой оболочке желудка наиболее активно экспрессируется ген *RALDH1* (*RALDH1* > *RALDH3* > *RALDH2*). При раке желудка содержание мРНК генов *RALDH2* и *RALDH3* из-

меняется незначительно, а уровень мРНК *RALDH1* заметно ниже в большинстве (57%) образцов рака желудка (табл. 3).

Содержание мРНК гена *CYP26A1* в нормальной слизистой оболочке желудка было незначительным. Несущественное повышение уровня этой мРНК (в среднем в 2.6 раза) выявлено в 53% опухолевых образцов. Уровень мРНК *CRBP1* оставался неизменным в большинстве опухолевых образцов (табл. 3).

Таким образом, паттерны экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез АТРА, полученные при помощи биоинформатического анализа, ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ, в основном совпадают. Значимых корреляций между изменением содержания мРНК исследованных генов, возрастом, полом, стадией опухоли, наличием метастазов не выявлено.

Таблица 3. Изменение уровня экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез АТРА, при раке желудка, определенное методами ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ

Ген	Изменение уровня мРНК при раке желудка		
	понижение	повышение	неизменный уровень
ADH4	84% (32/38) 31 (2.3–1790) $p < 0.0001$	3% (1/38) 16.7	13% (5/38)
ADH1B	53% (20/38) 15 (2.1–1538) $p = 0.0007$	10% (4/38) 6.1 (3.0–15.3)	37% (14/38)
ADH1C	58% (22/38) 23 (2.1–744) $p = 0.0007$	18% (7/38) 5.3 (2.2–12.7)	24% (9/38)
ADH3	23% (7/30) 3.5 (2.1–8.0)	13% (3/30) 4.8 (2.1–15.0)	64% (20/30)
RDHL	60% (18/30) 4.9 (2.5–10.0) $p = 0.0008$	20% (6/30) 4.6 (4.0–5.5)	20% (6/30)
RDH5	40% (12/30) 11.9 (2.5–10.0)	7% (2/30) 9.2 (6.4–12.0)	53% (16/30)
RDH10	17% (5/30) 3.7 (3.0–4.5)	7% (2/30) 3.2 (2.1–5.2)	76% (23/30)
RDH11	33% (10/30) 3.3 (2.1–5.5)	23% (7/30) 3.6 (2.1–10.2)	44% (13/30)
RDH12	84% (32/38) 37.8 (2.4–1999) $p < 0.0001$	8% (3/38) 2.2 (2.1–2.4)	8% (3/38)
AKR1B1	53% (16/30) 4.6 (2.5–10.1) $p = 0.0007$	17% (5/30) 2.9 (2.1–4.0)	30% (9/30)
AKR1B10	74% (28/38) 20.4 (2.1–393) $p < 0.0001$	13% (5/38) 6.1 (2.1–15)	13% (5/38)
RALDH1	57% (17/30) 4.8 (2.5–10.0) $p = 0.0001$	10% (3/30) 3.1 (2.5–4.0)	33% (10/30)
RALDH2	20% (6/30) 6.1 (3.0–10.0)	7% (2/30) 2.6 (2.2–3.0)	73% (22/30)
RALDH3	30% (9/30) 4.5 (2.1–4.3)	20% (6/30) 3.5 (2.5–5.5)	50% (15/30)
CYP26A1	13% (4/30) 2.7 (2.1–4.5)	53% (16/30) 2.6 (2.1–4.0) $p < 0.0001$	33% (10/30)
CRBP1	20% (6/30) 2.3 (2.1–5.5)	23% (7/30) 2.3 (3.5–10.0)	57% (17/30)

Примечание. Частоту изменений оценивали в процентах. В скобках указано количество образцов с измененным или неизменным уровнем мРНК/общее количество образцов. Ниже приведено среднее геометрическое значение изменения уровня мРНК (разы): в скобках – интервал изменений. Значение p подсчитано в случае доминирующего характера изменения уровня мРНК (затенено).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ретиноевая кислота играет важную роль в эмбриональном развитии, эпителиальной дифференцировке, росте клеток, поддержании нормального функционирования нервной и иммунной систем и в других процессах. Показано, что природные и синтетические формы АТРА спо-

собны подавлять пролиферацию опухолевых клеток, включая клетки рака желудка [29]. В слизистой оболочке желудка человека выявлено значительное количество АТРА, которая образуется из *all-trans*-ретинола в присутствии NAD^+ [24]. В биосинтез АТРА вовлечены многочисленные ферменты, проявляющие различную каталитическую активность, тканевую специфичность, суб-

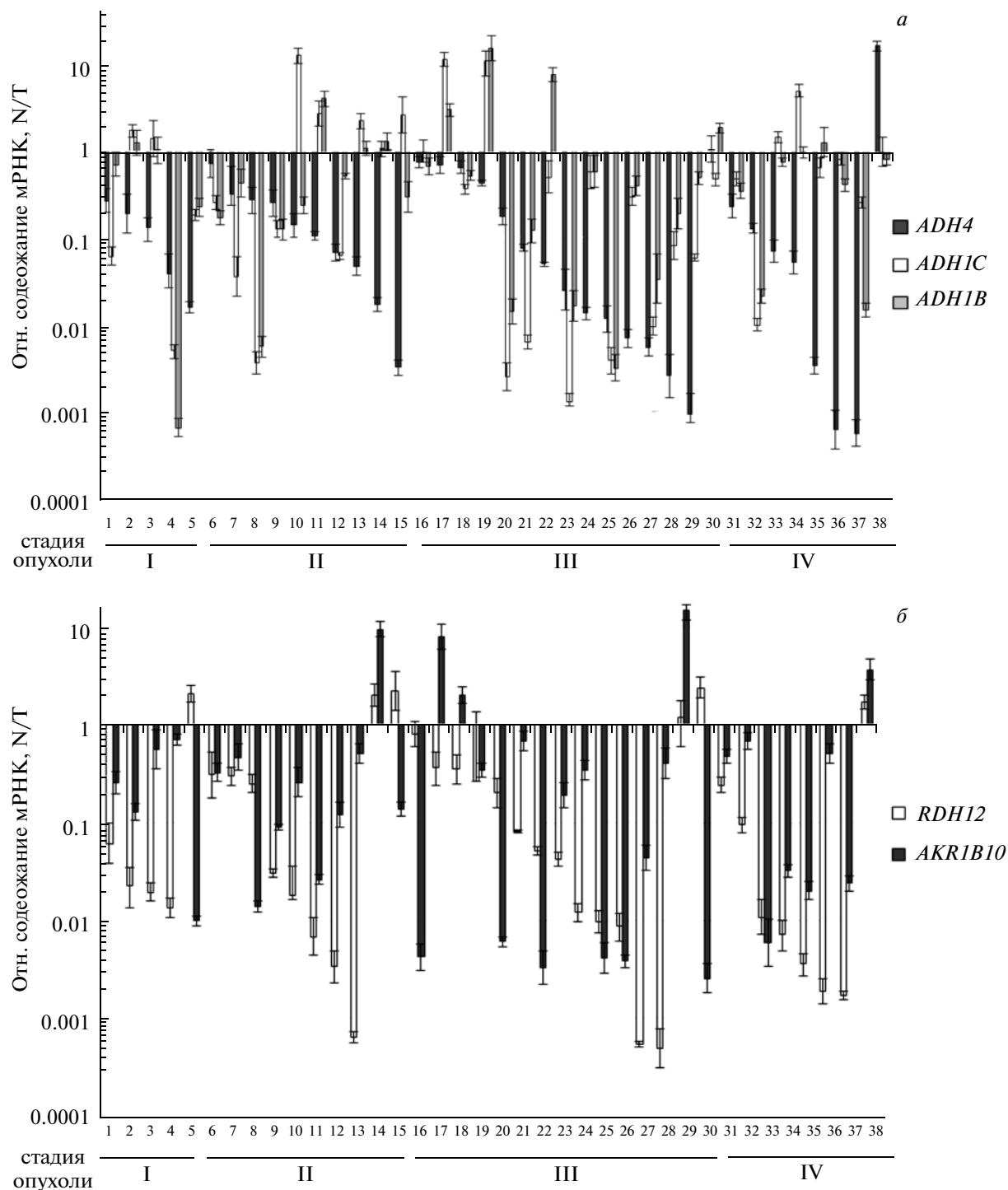


Рис. 2. Количественная оценка изменения уровня мРНК генов *ADH1C*, *ADH1B*, *ADH4* (а) и *AKR1B10*, *RDH12* (б) при раке желудка, определенная при помощи ПЦР-РВ в 38 парных образцах норма/опухоль. В качестве контрольного гена использован ген *ACTB*. I–IV – стадии рака желудка.

стратное и кофакторное предпочтение [3, 4, 10, 14]. Однако в большинстве случаев изучают экспрессию какого-то одного или нескольких генов или ферментов, вовлеченных в биосинтез АТРА и метаболические пути ретиноидов [17,

21, 30–32]. И лишь в относительно небольшом числе работ описывается сложная картина изменения профиля экспрессии различных участников метаболизма ретиноидов, например, при таких патологиях, как фиброма матки [33], неал-

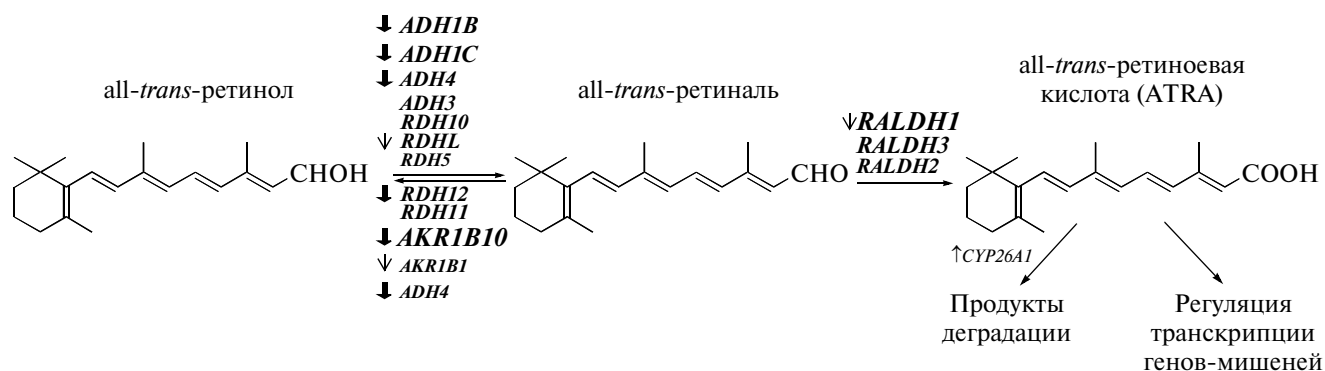


Рис. 3. Нарушение регуляции стадий биосинтеза АТРА при раке желудка. В клетках нормальной слизистой оболочки желудка *all-trans*-ретинол обратимо окисляется в *all-trans*-ретиноль под действием АДН (АДН1В, АДН1С, АДН3, АДН4) и NAD^+ -зависимых РДН (РДН10, РДНЛ, РДН5). Превращение ретиналя в ретинол катализируется NADP^+ -зависимыми РДН12 и РДН11, АКР1В10 и АКР1В1, а также АДН4. *All-trans*-ретиноль необратимо окисляется в АТРА под действием RALDH1, -2 и -3. АТРА может быть деградирован CYP26A1. Черные стрелки показывают изменение уровня экспрессии генов в образцах опухолей желудка относительно нормальных тканей. Толщина и размер шрифта символов генов, вовлеченных в биосинтез АТРА, отражают уровень их экспрессии в нормальных тканях желудка, а толщина и размер стрелок – уровень изменения экспрессии генов в опухолевых тканях по сравнению со смежными нормальными тканями.

когольная жировая инфильтрация печени [34] и синдром тестикулярной феминизации у мышей [35]. Ключевые гены или ферменты, ответственные за биосинтез АТРА, остаются неизвестными во многих тканях, включая нормальные и опухолевые ткани желудка.

На основе анализа современных биомедицинских данных нами составлен список генов, которые могут участвовать в биосинтезе АТРА, и проведен анализ транскриптомных баз данных с целью идентификации генов, потенциально вовлеченных в этот процесс в тканях желудка (табл. 1). Уровень экспрессии большинства из этих генов при раке желудка изменен по сравнению с нормальными тканями. Используемые нами данные микроэрей-анализа давно и успешно применяются для предварительной оценки уровня экспрессии генов [27]. Гены для количественной оценки экспрессии при помощи ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ были отобраны с учетом каталитической активности и субстратной специфичности кодируемых ими ферментов (табл. 1).

В реакции окисления *all-trans*-ретинола в ретиноль в нормальной слизистой оболочке желудка могут участвовать как АДН (АДН1В, АДН1С, АДН4 и АДН3), так и NAD^+ -зависимые РДН (РДН10, РДНЛ и РДН5). Наиболее существенно изменяется уровень экспрессии генов *ADH4*, *ADH1B* и *ADH1C* (рис. 2, табл. 3), т.е. наиболее активных генов. Уровень мРНК гена *RDHL* изменяется не столь заметно, а уровень мРНК *RDH10*, *ADH3* и *RDH5* в опухолях желудка остается таким же, как и в нормальных тканях. Для оценки суммарного эффекта выявленных изменений на биосинтез АТРА необходимо учитывать не только

уровень экспрессии генов, но и активность кодируемых ими ферментов. И хотя сравнивать кинетические константы нужно с большой осторожностью, поскольку при их определении часто используют различные методологии, можно с уверенностью сказать, что наибольшую активность в реакции окисления *all-trans*-ретинола проявляют АДН4, РДН10, АДН1С и АДН1В [10, 13], необходимые для окисления *all-trans*-ретинола в ретиноль *in vivo*. Например, у мутантных мышей *Adh1*^{-/-} синтезируется в 10 раз меньше АТРА, чем у мышей дикого типа [4, 7]. Добавление ингибиторов АДН – 4-метилпиразола, этанола, ранитидингидрохлорида или циметидина, снижает образование АТРА у мышей [24, 36].

Оксидоредуктазы АДН3, РДНЛ и РДН5 характеризуются низкой каталитической активностью в реакции окисления *all-trans*-ретинола [8, 37, 38], поэтому вклад этих ферментов в реакцию окисления ретинола, учитывая также их более низкое содержание в тканях желудка, значительно меньше, чем у АДН4, АДН1 и РДН10. Из всех NAD^+ -зависимых ретиноид-активных оксидоредуктаз РДН10 имеет самое низкое значение K_M для *all-trans*-ретинола (~0.035 мкМ) [13]. Опубликованные величины каталитической активности изоферментов АДН широко варьируют, хотя средние значения кинетических констант АДН1 и РДН10 в реакции окисления *all-trans*-ретинола существенно не отличаются ($K_M = 0.035$ – 0.182 мкМ для членов семейства АДН1) [39]. Следует отметить, что содержание мРНК генов *ADH1B*, *ADH1C* и *ADH4* значительно снижается уже на ранних стадиях развития рака желудка. Более чем в 90% опухолевых образцов наблюдается существенное

снижение уровня экспрессии хотя бы одного из этих генов (рис. 2), поэтому менее активный в тканях желудка *RDH10* не способен компенсировать потерю экспрессии этих генов. Таким образом, в подавляющем большинстве опухолевых образцов мы выявили резкое снижение уровня мРНК генов, которые кодируют высокоактивные ферменты окисления *all-trans*-ретинола в ретиналь и экспрессируются на высоком уровне в тканях желудка, что должно привести к значительному уменьшению образования ретиналя и, соответственно, АТРА, а также к накоплению ретинола (рис. 3).

Наиболее активная среди всех ретинол-окисляющих ферментов АДН4 локализована в пищеварительном тракте, в основном в тканях желудка. Уменьшение активности АДН4, сопровождаемое снижением уровня АТРА, связано с усилением воспаления, атрофии и кишечной метаплазии [21]. Кинетические и генетические исследования показывают, что АДН1 и АДН4 могут выполнять две важные физиологические функции – окислять этанол в желудке и участвовать в синтезе АТРА. Нарушение синтеза АТРА под действием этанола может лежать в основе патогенеза алкогольного синдрома и онкозаболеваний верхней части желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с употреблением алкоголя [40].

В реакции восстановления ретиналя в ретинол в тканях желудка участвуют NADP⁺-зависимые RDH (RDH11 и RDH12), AKR (AKR1B10 и AKR1B1), а также АДН (преимущественно АДН4 и в значительно меньшей степени АДН1). Содержание их мРНК понижается в ряду: *AKR1B10* > *ADH1B* = *ADH1C* > *ADH4* = *RDH12* = *RDH11* > *AKR1B1*. Наибольшей ретиналь-восстанавливающей активностью обладают RDH12, АДН4, RDH11 и AKR1B10 [10, 14], а наиболее существенно изменяется экспрессия генов *RDH12*, *ADH4*, *AKR1B10*, *ADH1B* и *ADH1C*, т.е. генов, самых активных в тканях желудка. Таким образом, мы наблюдаем нарушение конверсии ретиналя в ретинол при раке желудка.

В тканях желудка человека окисление ретиналя в АТРА катализируется RALDH1, -2 и -3. Нами показано, что ген *RALDH1* экспрессируется на значительно более высоком уровне, чем ген *RALDH3* и особенно *RALDH2*. Содержание ретиноевой кислоты в крови мышей *Raldh*^{-/-} значительно ниже, чем у мышей дикого типа [41]. Снижение синтеза АТРА наблюдали и при добавлении ацетальдегида – ингибитора RALDH [24]. Обнаруженное нами значительное понижение экспрессии гена, кодирующего основной, в тканях желудка, *all-trans*-ретиноль-окисляющий фермент, RALDH1, также может приводить к уменьшению образования АТРА.

Цитохром CYP26A1 катализирует расщепление АТРА в тканях желудка на неактивные по-

лярные метаболиты [16]. Выявленное нами небольшое повышение уровня экспрессии гена *CYP26A1* показывает, что деградация АТРА, пусть и незначительно, усиливается в опухолях желудка, что также может приводить к уменьшению количества АТРА.

Различные эпителиальные ткани могут отличаться не только набором экспрессирующихся генов ключевых ферментов синтеза АТРА, но и изменением профиля их экспрессии при канцерогенезе. Например, экспрессия гена *AKR1B10* резко возрастает при немелкоклеточном раке легкого и раке печени [30, 42, 43] и значительно снижается в опухолях желудочно-кишечного тракта – рак толстой кишки [44] и рак желудка (данная работа).

В пищеварительном тракте АДН, АКР и RALDH, кодируемые проанализированными в нашей работе генами, могут участвовать как в биосинтезе АТРА, так и в детоксикации организма [45, 46]. Снижение содержания этих ферментов в желудке может приводить к различным эффектам, связанным не только с дефицитом АТРА, но также с токсичностью эндогенных и экзогенных спиртов и альдегидов. Токсичность ретинола показана на мышах *Adh1*^{-/-}, у которых резко снижен биосинтез АТРА [7]. Белок CRBP1 регулирует транспорт ретинола. Этот белок может защищать ретинол от окисления в ретиналь и его конверсии в АТРА. Нами показано, что в большинстве опухолей желудка экспрессия гена *CRBP1* не изменяется, поэтому вместе с повышением содержания ретинола в опухоли возрастает и количество свободного ретинола, который может подвергаться гидроксигированию под действием цитохромов P450 с образованием токсичных побочных продуктов [47].

Существует несколько механизмов, посредством которых АТРА выполняет свою биологическую функцию – регулирует экспрессию большого числа генов, в том числе через связывание и активацию ядерных рецепторов [1]. АТРА взаимодействует с рецепторами RAR (α , β , γ), которые формируют гетеродимерный комплекс с ретиноидными X-рецепторами (RXR α , β , γ), и в составе этого комплекса влияет на транскрипцию АТРА-зависимых генов. Гены-мишени АТРА часто содержат элементы ответа на ретиноевую кислоту (retinoic acid response element, RARE), к которым и присоединяется гетеродимер RAR/RXR. Комплекс АТРА-RAR/RXR может регулировать экспрессию генов и независимо от RARE. Ретиноевая кислота влияет также на активность ядерных рецепторов, отличных от RAR и RXR. Контроль транскрипции генов-мишеней может осуществляться как прямым воздействием гетеродимера ядерных рецепторов, так и опосредоваться промежуточными факторами транскрипции. В число генов, регулируемых АТРА, входят

такие известные, как гены циклинов и циклин-зависимых киназ (CDK), участвующих в регуляции клеточного цикла, гены ингибиторов CDK, гомеостатические гены *Hox*, контролирующие процессы роста и дифференцировки, специфичный для рака желудка онкоген *RAMP*, кодирующий ассоциированный с ядерным матриксом белок, а также гены, связанные с метаболизмом и сигнальным путем ретиноидов (*CRBP1*, *ADH3*, *CYP26A1*, *RARα2*, *RARβ2* и др.). Ретиноевая кислота регулирует транскрипцию большого количества некодирующих РНК посредством димеров RAR/RXR [1, 48, 49]. Взаимодействие между ATRA и рецепторами ретиноидов необходимо для функционирования ретиноидной сигнальной системы. Изменение экспрессии генов *RAR* и *RXR*, приводящее к нарушению сигнальной функции, выявлено при различных формах рака, включая рак желудка [48, 50].

Нами впервые показана сложная картина изменения экспрессии большого числа генов, вовлеченных в биосинтез ATRA, при раке желудка. Выявлены нарушения на всех этапах этого процесса. ATRA — плеiotропный регулятор транскрипционной активности многих генов, относится к важным факторам, необходимым для нормальной клеточной дифференцировки и пролиферации. Возможно, что подавление синтеза ATRA вызывает множество патологических изменений в нормальной слизистой оболочке желудка [21]. Полагают, что нарушение баланса ретиноевой кислоты связано с патогенезом предраковых состояний и злокачественных опухолей в слизистой оболочке желудка [51].

Большинство ключевых ферментов, вовлеченных в биосинтез ATRA, можно отнести к категории полифункциональных. Они участвуют не только в метаболизме ретиноидов, но и катаболизме нейромедиаторов, конверсии стероидных гормонов и омега-окисных кислот, синтезе холестерина и желчных кислот, а также в защите от экзогенного этанола и эндогенных токсических соединений. Следовательно, изменения экспрессии генов, проанализированные в нашей работе, могут приводить к нарушению регуляции не только метаболического и сигнального путей ретиноидов, но и многих других систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-01760-а и 12-04-00388-а), Международного научно-технического центра (№ 3909) и Министерства образования и науки (ГК № 16.552.11.7034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blomhoff R., Blomhoff H.K. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* **66**, 606–630.
- Harrison E.H. 2012. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821**, 70–77.
- Napoli J.L. 2012. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821**, 152–167.
- Kumar S., Sandell L.L., Trainor P.A., Koentgen F., Duester G. 2012. Alcohol and aldehyde dehydrogenases: Retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821**, 198–205.
- Duester G., Farrés J., Felder M.R., Holmes R.S., Höög J.O., Parés X., Plapp B.V., Yin S.J., Jörnvall H. 1999. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 389–395.
- Estonius M., Svensson S., Höög J.-O. 1996. Alcohol dehydrogenase in human tissues: localization of transcripts coding for five classes of the enzyme. *FEBS Lett.* **397**, 338–342.
- Molotkov A., Deltour L., Foglio M.H., Cuenca A.E., Duester G. 2002. Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 13804–13811.
- Molotkov A., Fan X., Deltour L., Foglio M.H., Martiras S., Farrés J., Parés X., Duester G. 2002. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5337–5342.
- Gallego O., Belyaeva O.V., Porté S., Ruiz F.X., Stetsenko A.V., Shabrova E.V., Kostereva N.V., Farrés J., Parés X., Kedishvili N.Y. 2006. Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem. J.* **399**, 101–109.
- Parés X., Farrés J., Kedishvili N., Duester G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3936–3949.
- Lidén M., Eriksson U. 2006. Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **281**, 13001–13004.
- Kallberg Y., Oppermann U., Persson B. 2010. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS J.* **277**, 2375–2386.
- Belyaeva O.V., Johnson M.P., Kedishvili N.Y. 2008. Kinetic analysis of human enzyme RDH10 defines the characteristics of a physiologically relevant retinol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **283**, 20299–20308.
- Belyaeva O.V., Korkina O.V., Stetsenko A.V., Kim T., Nelson P.S., Kedishvili N.Y. 2005. Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids. *Biochemistry.* **44**, 7035–7047.

15. Crosas B., Hyndman D.J., Gallego O., Martras S., Parés X., Flynn T.G., Farrés J. 2003. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem. J.* **373**, 973–979.
16. Ross A.C., Zolfaghari R. 2011. Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **31**, 65–87.
17. Jette C., Peterson P.W., Sandoval I.T., Manos E.J., Hadley E., Ireland C.M., Jones D.A. 2004. The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J. Biol. Chem.* **279**, 34397–34405.
18. Pasquali D., Thaller C., Eichele G. 1996. Abnormal level of retinoic acid in prostate cancer tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2186–2191.
19. Mira Y.L.R., Zheng W.L., Kuppumbatti Y.S., Rexer B., Jing Y., Ong D.E. 2000. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J. Cell Physiol.* **185**, 302–309.
20. Williams S.J., Cvetkovic D., Hamilton T.C. 2009. Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **112**, 637–645.
21. Matsumoto M., Yokoyama H., Suzuki H., Shiraishi-Yokoyama H., Hibi T. 2005. Retinoic acid formation from retinol in the human gastric mucosa: role of class IV alcohol dehydrogenase and its relevance to morphological changes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G429–433.
22. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**, 69–90.
23. Давыдов М.И., Аксель Е.М. 2011. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2009 г. Смертность населения России и стран СНГ в 2009 от злокачественных новообразований в 2009 г. *Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* **22** (прил. 1), 54–123.
24. Yokoyama H., Matsumoto M., Shiraishi H., Miyagi M., Kato And S., Ishii H. 2001. Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent retinoic acid formation from retinol in the human gastric mucosa: inhibition by ethanol, acetaldehyde, and H2 blockers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 24S–28S.
25. Persson C., Sasazuki S., Inoue M., Kurahashi N., Iwasaki M., Miura T., Ye W., Tsugane S.; JPHC Study Group. 2008. Plasma levels of carotenoids, retinol and tocopherol and the risk of gastric cancer in Japan: a nested case-control study. *Carcinogenesis.* **29**, 1042–1048.
26. Larsson S.C., Bergkvist L., Näslund I., Rutegård J., Wolk A. 2007. Vitamin A, retinol, and carotenoids and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 497–503.
27. Rhodes D.R., Yu J., Shanker K., Deshpande N., Varambally R., Ghosh D., Barrette T., Pandey A., Chinnaiyan A.M. 2004. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia.* **6**, 1–6.
28. Манзеньюк О.Ю., Малахо С.Г., Пехов В.М., Косорукова И.С., Полтараус А.Б. 2006. Характеристика универсальных отечественных наборов реагентов для ПЦР в реальном времени. *Молекуляр. биология.* **40**, 349–356.
29. Zhang J.P., Chen X.Y., Li J.S. 2007. Effects of all-trans-retinoic on human gastric cancer cells BGC-823. *J. Dig. Dis.* **8**, 29–34.
30. Fukumoto S., Yamauchi N., Moriguchi H., Hippo Y., Watanabe A., Shibahara J., Taniguchi H., Ishikawa S., Ito H., Yamamoto S., Iwanari H., Hironaka M., Ishikawa Y., Niki T., Sohara Y., Kodama T., Nishimura M., Fukayama M., Dosaka-Akita H., Aburatani H. 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1776–1785.
31. Leclerc J., Courcot-Ngoubo Ngangué E., Cauffiez C., Allorge D., Pottier N., Lafitte J.J., Debaert M., Jailard S., Broly F., Lo-Guidice J.M. 2011. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung: transcript profiling in non-tumoral and tumoral tissues. *Biochimie.* **93**, 1012–1027.
32. Chiang C.P., Jao S.W., Lee S.P., Chen P.C., Chung C.C., Lee S.L., Nieh S., Yin S.J. 2012. Expression pattern, ethanol-metabolizing activities, and cellular localization of alcohol and aldehyde dehydrogenases in human large bowel: association of the functional polymorphisms of ADH and ALDH genes with hemorrhoids and colorectal cancer. *Alcohol.* **46**, 37–49.
33. Zaitseva M., Vollenhoven B.J., Rogers P.A. 2007. Retinoic acid pathway genes show significantly altered expression in uterine fibroids when compared with normal myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **13**, 577–585.
34. Ashla A.A., Hoshikawa Y., Tsuchiya H., Hashiguchi K., Enjoji M., Nakamuta M., Taketomi A., Maehara Y., Shomori K., Kurimasa A., Hisatome I., Ito H., Shiota G. 2010. Genetic analysis of expression profile involved in retinoid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* **40**, 594–604.
35. O'Shaughnessy P.J., Abel M., Charlton H.M., Hu B., Johnston H., Baker P.J. 2007. Altered expression of genes involved in regulation of vitamin A metabolism, solute transportation, and cytoskeletal function in the androgen-insensitive tfm mouse testis. *Endocrinology.* **148**, 2914–2924.
36. Collins M.D., Eckhoff C., Chahoud I., Bochert G., Nau H. 1992. 4-Methylpyrazole partially ameliorated the teratogenicity of retinol and reduced the metabolic formation of all-trans-retinoic acid in the mouse. *Arch. Toxicol.* **66**, 652–659.
37. Chetyrkin S.V., Belyaeva O.V., Gough W.H., Kedishvili N.Y. 2001. Characterization of a novel type of human microsomal 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: unique tissue distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* **276**, 22278–22286.
38. Wang J., Chai X., Eriksson U., Napoli J.L. 1999. Activity of human 11-cis-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue. *Biochem. J.* **338**, 23–27.

39. Chase J.R., Poolman M.G., Fell D.A. 2009. Contribution of NADH increases to ethanol's inhibition of retinol oxidation by human ADH isoforms. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **33**, 571–580.
40. Yin S.J., Chou C.F., Lai C.L., Lee S.L., Han C.L. 2003. Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem. Biol. Interact.* **143/144**, 219–227.
41. Molotkov A., Duester G. 2003. Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase Raldh1 (Aldh1a1) functions downstream of alcohol dehydrogenase Adh1 in metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **278**, 36085–36090.
42. Машкова Т.Д., Опарина Н.Ю., Зиновьева О.Л., Кропотова Е.С., Дубовая В.И., Полтараус А.Б., Фридман М.В., Копанцев Е.П., Виноградова Т.В., Зиновьева М.В., Лактионов К. К., Касымова О.Т., Зборовская И.Б., Свердлов Е.Д., Киселев Л.Л. 2006. Транскрипция генов *TIMP3*, *DAPK1* и *AKR1B10* при плоскоклеточном раке легких. *Молекуляр. биология.* **40**, 1047–1054.
43. Scuric Z., Stain S.C., Anderson W.F., Hwang J.J. 1998. New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **27**, 943–950.
44. Кропотова Е.С., Тычко Р.А., Зиновьева О.Л., Зырянова А.Ф., Ханкин С.Л., Черкес В.Л., Алиев В.А., Берестень С.Ф., Опарина Н.Ю., Машкова Т.Д. 2010. Снижение экспрессии гена *AKR1B10* при колоректальном раке. *Молекуляр. биология.* **44**, 243–250.
45. Martin H.J., Maser E. 2009. Role of human aldo-ketoreductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. *Chem. Biol. Interact.* **178**, 145–150.
46. Westerlund M., Belin A.C., Felder M.R., Olson L., Galter D. 2007. High and complementary expression patterns of alcohol and aldehyde dehydrogenases in the gastrointestinal tract: implications for Parkinson's disease. *FEBS J.* **274**, 1212–1223.
47. Roberts E.S., Vaz A.D.N., Coon M.J. 1992. Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol. Pharmacol.* **41**, 427–433.
48. Tang X.H., Gudas L.J. 2011. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 345–364.
49. Li J., Ng E.K., Ng Y.P., Wong C.Y., Yu J., Jin H., Cheng V.Y., Go M.Y., Cheung P.K., Ebert M.P., Tong J., To K.F., Chan F.K., Sung J.J., Ip N.Y., Leung W.K. 2009. Identification of retinoic acid-regulated nuclear matrix-associated protein as a novel regulator of gastric cancer. *Br. J. Cancer.* **101**, 691–698.
50. Hu K.W., Chen F.H., Ge J.F., Cao L.Y., Li H. 2012. Retinoid receptors in gastric cancer: expression and influence on prognosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, 1809–1817.
51. Jiang S.Y., Shen S.R., Shyu R.Y., Yu J.C., Harn H.J., Yeh M.Y., Lee M.M., Chang Y.C. 1999. Expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant and malignant gastric tissues determined by *in situ* hybridization. *Br. J. Cancer.* **80**, 206–214.