

А.П. Бурлака¹
 А.В. Вовк¹
 І.І. Ганусевич¹
 А.А. Бурлака²
 С.М. Лукін³
 С.В. Вірко³

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

²Національний інститут раку МОЗ України

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

Ключові слова: метастазуючий колоректальний рак, печінка, редокс-стан сайтів віддаленого метастазування.

СУПЕРОКСИД- ТА NO-ЗАЛЕЖНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ МЕТАСТАТИЧНОГО МІКРООТОЧЕННЯ ВІДДАЛЕНИХ САЙТІВ МЕТАСТАЗУВАННЯ ХВОРИХ НА КОЛОРЕКТАЛЬНИЙ РАК

Мета: дослідити особливості редокс-стану метастазів (М), тканини печінки (ТП), крові та сечі хворих на метастатичний колоректальний рак (мКРР) із ураженням печінки. **Об'єкт і методи дослідження:** проведено дослідження тканини М; ТП, яка безпосередньо контактує з М; ТП, взятої на відстані 5 см від М; сечі та крові 25 хворих на мКРР із ураженням печінки. Активність залізо-сірчаних білків N-2 (FeS-білків N-2) електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій, рівні лактоферину (ЛФ), вільного заліза (ВЗ) визначали методом електронного парамагнітного резонансу (77 К). Рівні супероксидних радикалів (СР) та оксиду азоту (NO) визначали за допомогою технології спінових уловлювачів (Spin Traps). Активність матриксних металопротеїназ (ММП-2 і -9) реєстрували методом зимографії в поліакриламідному гелі. **Результати:** при мКРР з М в печінці виявлено порушення функціонування цитохрому P450 у системі детоксикації гепатоцитів, дефекти в ЕТЛ мітохондрій (комплекси NO з FeS-білками — NOFeS-білки), порушення метаболізму кисню та заліза, зміни ступеня деструкції міжклітинного матриксу. Найбільш вираженими ці порушення були в ТП, яка прилягає до М (ділянки формування метастатичного мікрооточення), що проявлялося зниженням рівнів цитохрому P450, зростанням рівнів комплексів NOFeS-білків, ЛФ, ВЗ, ММП-2, -9 та швидкістю генерування СР і NO порівнянно з ТП на відстані 5 см від М. У крові хворих на мКРР виявлено високі (порівняно з пацієнтами із КРР без метастазів) рівні супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів, активних форм желатиназ. **Висновки:** досліджені показники редокс-стану печінки, оперованої з приводу мКРР, можуть бути використані для оцінки функціонального стану органів та тканин віддаленого метастазування, ризиків виникнення рецидивів онкологічних захворювань та удосконалення терапевтичних підходів.

ВСТУП

Сучасними дослідженнями доведено, що більшість хронічних захворювань печінки пов'язані з накопиченням пошкоджень у мітохондріях. Останні є центром, який об'єднує метаболізм вуглеводів, ліпідів і білків, а також відіграють важливу роль у виживанні гепатоцитів, виступаючи медіатором апоптозу і некрозу [1–3]. Водночас на фоні дисфункції мітохондрій, яка призводить до нерегульованого генерування супероксидних радикалів (СР) та активації синтезу оксиду азоту (NO), виникає також і пухлинний процес. Встановлено, що тривале підвищення рівнів СР і NO є одним з основних факторів ризику розвитку та прогресування онкологічного захворювання [4].

Солідні новоутворення, в тому числі первинні та вторинні злоякісні пухлини печінки, складаються в основному з пухлинних і стромальних клітин. Стро-

ма пухлини містить фібробласти, ендотеліальні клітини кровеносних судин та імунні клітини. Інфільтрація пухлини імунними клітинами (лімфоцитами, макрофагами і нейтрофілами) зазвичай асоціюється з пухлинною прогресією [5–7]. Нейтрофіли є найбільш численними лейкоцитами у крові, вони першими реагують на пошкодження тканин та інфекції, в умовах хронічного запалення накопичуються в тканинах, а також інфільтрують пухлини, зокрема їхній міжклітинний матрикс. У недавніх дослідженнях показано, що нейтрофіли мають здатність до трансміграції, тобто до зворотної міграції з тканин у судинну мережу. Роль цих клітин у мікрооточенні пухлин залишається неясною щодо їх про- та протипухлинної дії. Пухлиноасоційовані нейтрофіли (ПАН) можуть проявляти протипухлинні ефекти, маючи здатність генерувати СР та NO. Однак на практиці їхня актив-

Характеристика хворих на мКРР та проведеного лікування

Показники	Кількість (n)
Локалізація первинної пухлини:	
пряма кишка	7
ободова кишка	18
Резекції:	
одномоментні	4
двохетапні	21
М іншої локалізації на момент резекції печінки:	
легені	5
черевна порожнина	2
Поліхіміотерапія до операції на печінці:	
FOLFOX-6 (≤ 3)	7
FOLFOX-6 (> 3)	3
XELOX (≤ 3)	6
XELOX (> 3)	5
FOLFIRI (≤ 3)	3
Стан хворого за шкалою ASA:	
I-II	11
III	3
Кількість видалених сегментів печінки:	
≤ 3	11
> 3	14
Розмір МВ	
< 5 мм	9
> 1 см	16

ність корелює з поганим прогнозом, а наявність у мікрооточенні пухлини асоційована з прогресуванням захворювання [2, 8, 9]. Механізм цього явища лише починають з'ясувати, але є всі підстави вважати, що він пов'язаний з окисно-індукованою генотоксичністю CP і NO, їх впливом на процеси ангиогенезу та імуносупресії.

Великі резекції печінки з приводу метастатичного ураження, зокрема, у хворих на метастатичний колоректальний рак (мКРР) можуть впливати на поведінку вторинних сайтів метастазування пухлин та викликати печінкову недостатність [10–14]. Хірургічний стрес може стимулювати інвазію пухлинних клітин, їхню міграцію та метастазування за рахунок активації джерел генерування CP та NO (електронтранспортний ланцюг (ЕТЛ) мітохондрій, цитохром P450, НАДФ-Н-оксидаза (NOX) та індукбельна NO-синтаза (iNOS)) [15–17]. З іншого боку, ці фактори можуть впливати на перебіг процесу регенерації тканин печінки (ТП), які забезпечують її пострезекційне відновлення.

Усе вищевикладене зумовлює важливість розробки нових підходів до контролю функціонального стану печінки при метастазуванні злоякісних пухлин, зокрема, на основі вивчення показників її редокс-стану. Може бути перспективною оцінка інформативності цих показників як тригера агресивної поведінки пухлинних клітин і, відповідно, розвитку рецидиву захворювання, а також для прогнозування регенерації або деградації ТП після резекції.

Мета дослідження: вивчити особливості редокс-стану метастазів (М) в печінці, їх мікрооточення, віддаленої ТП, а також крові та сечі хворих на мКРР після хірургічного лікування.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено дослідження метастатичних вузлів (МВ); ТП, яка безпосередньо контактує з МВ; ТП, зразки якої взяті на відстані 5 см від МВ; крові та сечі 25 хворих на мКРР із метакронним ураженням печінки, яким виконали хірургічне лікування у Національному інституті раку. Пацієнти отримували поліхіміотерапію згідно із затвердженими міжнародними та вітчизняними стандартами, а також клінічними протоколами на період проведення досліджень із лютого 2016 по січень 2017 р. За умовно здорову (контроль) вважали ТП (біопсійний матеріал), взятую пацієнтів із доброякісними новоутвореннями в печінці, які не отримували хіміотерапії, без гепатиту та інших захворювань печінки в анамнезі. Крім того, досліджено зразки крові та сечі хворих ($n = 12$) на КРР категорії M0 (5 хворих з II стадією, 7 — з III стадією, N1–2), а також практично здорових донорів ($n = 11$). Групи обстежених були зіставні за віком — 32–56 років. Усі пацієнти дали інформовану згоду на участь у дослідженні та використання їх біологічних матеріалів у дослідницьких цілях.

Характеристика хворих на мКРР та проведеного лікування наведена в табл. 1.

Активність залізо-сірчаних білків N-2 (FeS-білки N-2) ЕТЛ, рівень комплексів NO з FeS-білками N-2 (NOFeS-білки) в мітохондріях, рівні лактоферину (ЛФ), вільного заліза (ВЗ) в тканині визначали методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) при температурі 77 К, для чого формували зразки за допомогою спеціальної прес-форми, заморожували в рідкому азоті, після чого проводили реєстрацію спектрів ЕПР у парамагнітно чистій кварцовій посудині Дьюара [18]. Рівні CP, NO, генерованих у мітохондріях клітин, NOX та iNOS нейтрофілів визначали методом ЕПР із застосуванням технології спінових уловлювачів (Spin Traps) [8, 19]. Стан міжклітинного матриксу печінки оцінювали за активністю матриксних металопротеїназ (ММП-2 і -9), яку реєстрували методом зимографії в поліакриламідному гелі [20]. За умовну одиницю (ум. од.) активності желатиназ у сироватці крові прийнято активність 1 мкг ферменту в 1 мл вихідного контрольного зразка [21]; в сечі — 1 мкг ферменту на 1 г креатиніну [22]. Статистичний аналіз виконували за допомогою прикладної ліцензійної програми Origin 7.0. Наведені результати вважали достовірними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зміни ЕПР-характеристик у ТП та МВ хворих на мКРР, яким виконано резекцію печінки, представлено на рис. 1 та в табл. 2. На рис. 1, а зазначено спектри ЕПР ТП на відстані 5 см від МВ. Вважається, що це умовно здорова ТП, але, аналізуючи показники стану відповідних функцій за спектрами ЕПР, можна дійти висновку про їхні якісні і кількісні відмінності від норми. Так, у ТП без ознак цирозу, гепатозу та іншої супутньої патології, на яку впливає М зі ступенем диференціювання G2 (див. рис. 1, а, спектри 1, 2, 3), виявлено зниження ак-

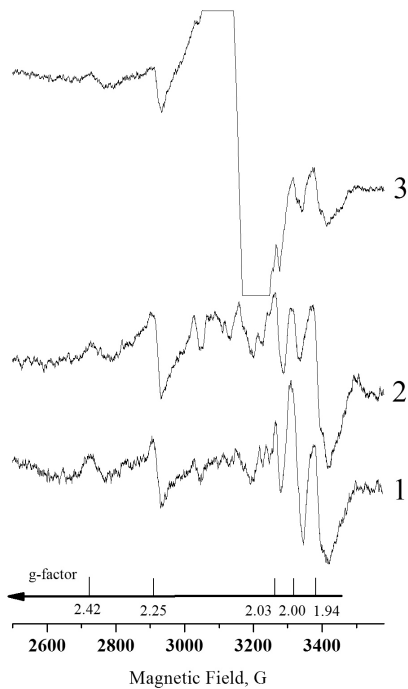
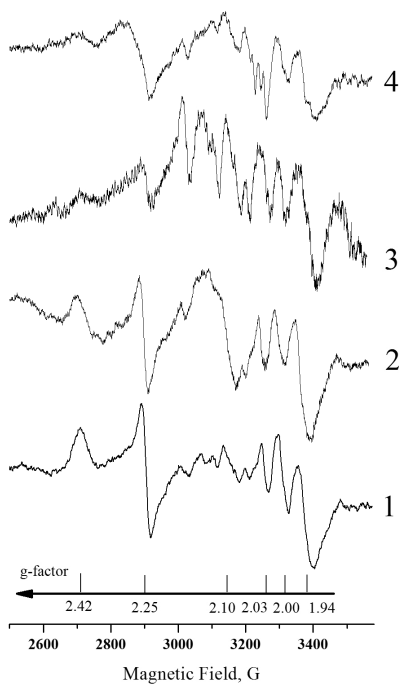
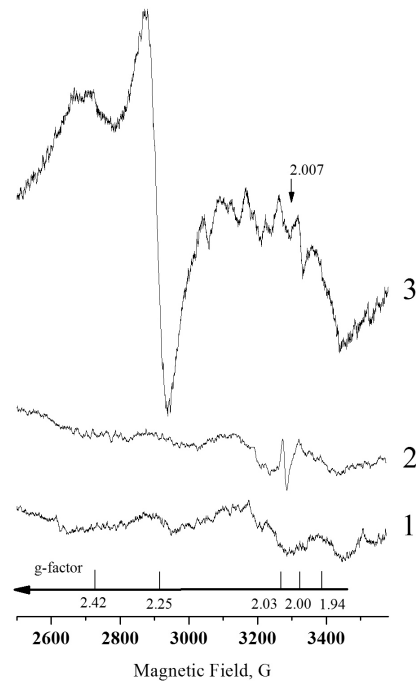
*a**b**b*

Рис. 1. Приклади спектрів ЕПР ТП, взятої на відстані 5 см від МВ (*a*); ТП, яка оточує МВ (*б*); тканини МВ (*в*). Спектри 1, 2 — розмір МВ < 5 мм; 3, 4 — розмір МВ > 1 см

цитохрому P450 системи детоксикації гепатоцитів, що проявляється зниженням інтенсивності сигналу ЕПР ($g = 2,25$) (рис. 1, *a*, спектр 1, 2). Для печінки при розмірі $M > 1$ см характерна не тільки дисфункція мітохондрій, а і втрата здатності до детоксикації (спектр 3). За цих умов спостерігається зростання рівнів комплексів NOFeS-білків з поступовим перепрограмуванням метаболізму кисню в мітохондріях з відповідним рівнем клітинної гіпоксії, що характеризується якісними змінами в ЕТЛ — формуванням триплетного сигналу ЕПР ($g = 2,007$) (спектр 3).

На рис. 1, *б* наведено спектри ЕПР ТП, яка відпрепарована із зон контакту з тканиною МВ і відображає безпосередній вплив клітин пухлини зі ступенем диференціювання G2 на гепатоцити та їхнє мікрооточення. За розміру МВ < 5 мм (рис. 1, *б*, спектри 1, 2) відбувається зниження активності FeS-білків N-2, зниження рівня убісеміхінону, цитохрому P450 та компенсаторне зростання активності убіхінон-цитохром с-редуктази і FeS-центру Rieske ($g = 2,10$) (спектр 2). МВ розміром > 1 см викликає в прилеглої до нього печінці (спектри 3, 4) зростання рівнів маркера клітинної гіпоксії — NOFeS-білків в I комплексі ЕТЛ мітохондрій, зниження активності FeS-білка N-2 та рівня убісеміхінону ($g = 2,00$) з формуванням триплетного сигналу; зростання низькомолекулярних комплексів Mn^{2+} та Fe^{2+} . Тривалий вплив M на прилеглу ТП (спектр 3, 4) спричиняє подальше поглиблення процесів перепрограмування метаболізму кисню в мітохондріях та зниження ефективності детоксикації до повної втрати активної форми редокс-циклу цитохрому P450.

тивності FeS-білків N-2 в ЕТЛ мітохондрій гепатоцитів ($g = 1,94$), що свідчить про порушення спряження окиснення з фосфорилуванням в NADH-убіхіноноксидоредуктазному комплексі ЕТЛ. У ТП, якій відповідає спектр 1, зростає рівень убісеміхінону ($g = 2,00$) — переносника електронів в дихальному ланцюгу мітохондрій — в 2 рази порівняно з умовно здоровою печінкою; в той же час в ТП, якій відповідає спектр 2, його рівень не змінюється, що, ймовірно, можна пояснити різною тривалістю впливу M та його мікрооточення. У ТП виявлено також порушення у функціонуванні редокс-циклу

На рис. 1, в наведено приклади спектрів ЕПР тканини МВ. Спектри 1, 2 відображають редокс-стан, характерний для злоякісно трансформованих клітин: низький рівень окисного фосфорилування та відсутність активності редокс-циклу цитохрому Р450 у системі детоксикації. Спектр 3 МВ також має спектральні ознаки злоякісно трансформованих клітин; його відмінність полягає в аномально високій активності цитохрому Р450 ($g = 2,25$).

Як видно з табл. 2, за наявності МВ у печінці відзначається достовірне ($p < 0,05$) зниження рівнів FeS-білків N-2 і цитохрому Р450 порівняно з контрольною тканиною здорової печінки, незалежно від відстані дослідженого зразка ТП від МВ та розмірів останнього. За наявності МВ діаметром > 1 см рівні FeS-білків N-2 і цитохрому Р450 були достовірно нижчими ($p < 0,05$), ніж за наявності МВ діаметром < 5 мм. Встановлено кореляційний зв'язок між активністю цитохрому Р450 в ТП на відстані 5 см від МВ та його розмірами ($r = -0,64$; $p < 0,05$) (рис. 2). Рівні убісеміхінону за наявності МВ < 5 мм достовірно зростали ($p < 0,05$) у ТП на відстані 5 см від М і знижувалися ($p < 0,05$) у прилеглій до М ТП. Усі описані вище зміни в редокс-стані ТП під впливом М призводять до нерегульованого зростання швидкості генерування СР у ній. Отримані нами дані свідчать про необхідність використання відповідних терапевтичних втручань для корекції функціонального стану залишкової ТП після резекції з приводу М.

Важливим елементом, який сприяє проліферації клітин та їхньому росту, є залізо. Крім того, іони ВЗ беруть участь в окисно-відновних реакціях у клітинах, формуючи їх редокс-стан. ЛФ є багатфункціональним залізовмісним глікопротеїном із сімейства трансферинів, що продукується залозистими клітинами та нейтрофілами в інфіковані тканини і кров під час запального процесу. ЛФ є одним з основних компонентів вродженої імунної системи, маючи на своїй поверхні залізо, яке може взаємодіяти з молекулярними і клітинними компонентами організму і патогенів [18, 23, 24]. ЛФ регулює біодоступність заліза при реалізації метаболічних функцій клітини, зокрема проліферації. Таким чином, ВЗ і ЛФ можна віднести до важливих чинників росту пухлин, їх мікрооточення та метастазування [25–27]. Як свідчать дані табл. 3, найвищі рівні ВЗ ($g = 2,2–2,4$) та ЛФ ($g = 4,3$) визначали в тканині МВ. У ТП, прилеглій до МВ, рівні обох чинників також були достовірно ($p < 0,05$) підвищеними порівняно з такими в ТП, взятій на відстані 5 см від МВ. Поява в пострезекційній печінці ВЗ може відбувати-

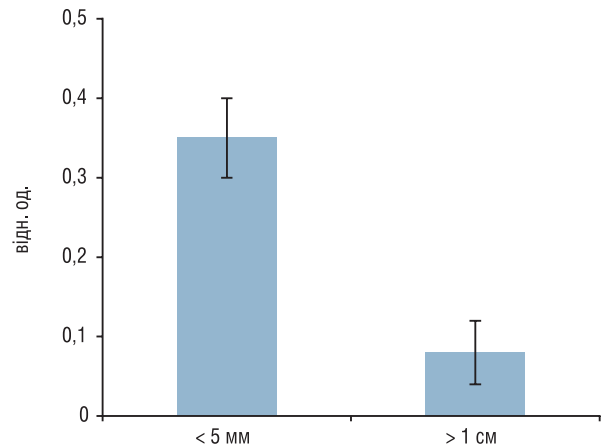


Рис. 2. Активність цитохрому Р450 в ТП на відстані 5 см від МВ залежно від його розміру

ся за рахунок декомпартменталізації йонів заліза внаслідок активації окисних пошкоджень ліпідів, білків, порушення мембран, деструкції залізовмісних білків, відновного перетворення трансферину на апотрансферин, а також виходу депонованого заліза із феритину. ВЗ є ефективним промотором радикальних реакцій і каталізує утворення супероксидних та гідроксильних радикалів, підтримуючи окисний фенотип [18, 23–26]. Дослідження рівнів ЛФ у ТП з М КРР встановило, що контакт МВ з ТП викликає в ній достовірне ($p < 0,05$) зростання вмісту ЛФ порівняно з ТП на відстані 5 см від МВ. У тканині МВ цей показник був ще вищим. Слід відзначити, що в здоровій печінці (контрольна ТП) ЛФ і ВЗ не визначалися. Таким чином, підвищення рівнів ЛФ і ВЗ у ТП може слугувати додатковим маркером у віддалених сайтах метастазування, оскільки їх рівень зростає не тільки в тканині М, а і в тканині органа-мішені.

Таблиця 3

ТП	Рівні ВЗ і ЛФ у ТП і МВ хворих на мКРР	
	Рівень, відн. од.	
	ВЗ	ЛФ
5 см від МВ	0,08 ± 0,03	0,13 ± 0,02
Прилегла до МВ	0,24 ± 0,05*	0,36 ± 0,05*
МВ	0,34 ± 0,04*	0,41 ± 0,06*

* $p < 0,05$ порівняно з ТП на відстані 5 см від МВ.

У табл. 4. представлено дані щодо швидкості генерування СР у ТП і МВ, а також у мітохондріях їх клітин. У зразках ТП хворих на мКРР (незалежно від відстані до МВ) та в тканині МВ швидкість генерування СР була достовірно вищою, ніж в контрольній ТП ($0,29 \pm 0,05$ нМ/г сирової тканини-хв; $p < 0,05$). Тканини МВ генерували СР з суттєво нижчою швидкістю порівняно з ТП на відстані 5 см від МВ. Різниця в швид-

Таблиця 2

Зміни ЕПР-характеристик ТП залежно від розміру МВ та відстані від нього

ТП	Рівень, відн. од.					
	FeS-білки N-2		Убісеміхінон		Цитохром Р450	
	< 5 мм	> 1 см	< 5 мм	> 1 см	< 5 мм	> 1 см
5 см від МВ	0,48 ± 0,06*	0,12 ± 0,02*.*	0,41 ± 0,04*	–	0,35 ± 0,05*	0,08 ± 0,04*.*
Прилегла до МВ	0,39 ± 0,04*	0,21 ± 0,03*.*	0,19 ± 0,02*	–	0,48 ± 0,05*	0,15 ± 0,02*.*
Здорова печінка (контроль)	1,51 ± 0,10		0,25 ± 0,02		2,56 ± 0,21	

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; * $p < 0,05$ порівняно з МВ < 5 мм.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

кості генерування СР мітохондріями клітин усіх досліджених зразків не встановлено, водночас усі показники достовірно перевищували значення контролю ($0,15 \pm 0,07$ нМ/г сирової тканини·хв; $p < 0,05$). Відмінності в рівнях швидкості генерування СР між тканиною та мітохондріями, можливо, зумовлені пухлино-асоційованими фагоцитуючими та нефагоцитуючими лейкоцитами [4, 7, 8]. Таким чином, мітохондрії клітин ТП, МВ та їх мікрооточення функціонують в умовах пошкоджувального впливу СР [6].

Таблиця 4

ТП	Рівні СР та NO у ТП та МВ		
	СР (нМ/г сирової тканини·хв)		NO (нМ/г сирової тканини)
	Тканина	Мітохондрії	Тканина
5 см від МВ	$1,10 \pm 0,12$	$0,69 \pm 0,09$	$1,45 \pm 0,13$
Прилегла до МВ	$1,31 \pm 0,15$	$0,75 \pm 0,07$	$2,56 \pm 0,36^*$
МВ	$0,83 \pm 0,09^*$	$0,79 \pm 0,09$	$1,77 \pm 0,22$

* $p < 0,05$ порівняно з ТП на відстані 5 см від МВ.

Рівні NO в МВ та ТП на відстані 5 см від МВ достовірно не відрізнялися від контрольних показників умовно здорової печінки ($1,51 \pm 0,18$ нМ/г сирової тканини), тоді як в ТП, прилеглий до МВ, цей показник статистично суттєво зростає ($p < 0,05$) (див. табл. 4). Виявлено, що рівні NO в ТП, прилеглої до МВ, прямо корелюють з кількістю видалених сегментів, тобто кількістю сформованих М ($r = 0,68$; $p = 0,05$) (рис. 3). Встановленим фактом є те, що NO відіграє важливу роль в ангиогенезі/лімфоангиогенезі [2, 28]. Зокрема, NO, генерований iNOS, яка функціонує в нейтрофілах, є посередником для VEGF-індукованого лімфоангиогенезу. Це свідчить, що NO бере участь на ранніх етапах метастазування, а підвищені рівні NO можуть асоціюватися з прогресуванням злоякісного процесу. Усі три ізоформи NO-синтази (nNOS, iNOS та eNOS) експресуються при пухлинах шлунково-кишкового тракту; високі рівні експресії iNOS та eNOS виявлено у хворих на КРР. Пухлинний ангиогенез відіграє важливу роль у прогресуванні пухлинного процесу, призводить до метастазування, зумовлює проліферацію за рахунок розвитку кровонесних судин у пухлині через активацію VEGF [28]. Нами розглянуто також механізми, пов'язані з супероксидом та NO-генеруючою активністю нейтрофілів не тільки в мікрооточенні МВ, але і в периферичній крові хворих на мКРР. Встановлено, що у цих пацієнтів нейтрофіли генерують СР і NO зі швидкістю, яка відповідно у 6 та 15 разів перевищує контрольні значення ($p < 0,001$) (рис. 4). Це свідчить, що за наявності М КРР у печінці нейтрофіли в крові активовані, що може забезпечувати їх суттєву участь у прогресуванні пухлинного процесу, опосередковану через вплив на ангиогенез та імуносупресію.

Активність ММП визначали в МВ, а також у безпосередньо прилеглий ТП та ТП на відстані 5 см, в сироватці периферичної крові та сечі пацієнтів з мКРР (табл. 5). Важливо відмітити, що активність ММП-2 та -9 виявлено в усіх зразках, включно зі зразками ТП, препаративаними на відстані 5 см від МВ, тобто умовно здорової ТП. Активність

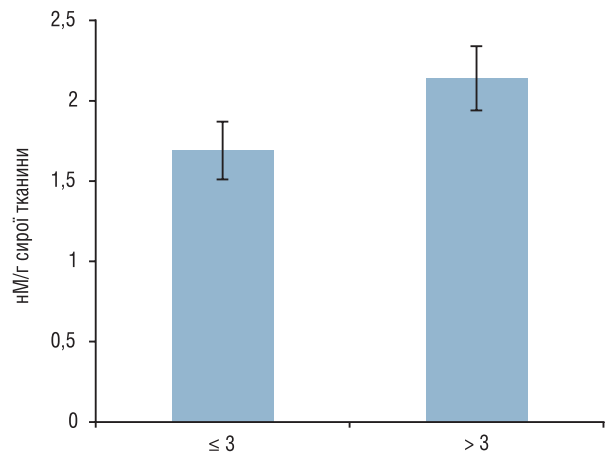


Рис. 3. Рівні NO в ТП, яка оточує МВ, залежно від кількості видалених сегментів печінки (≤ 3 або > 3)

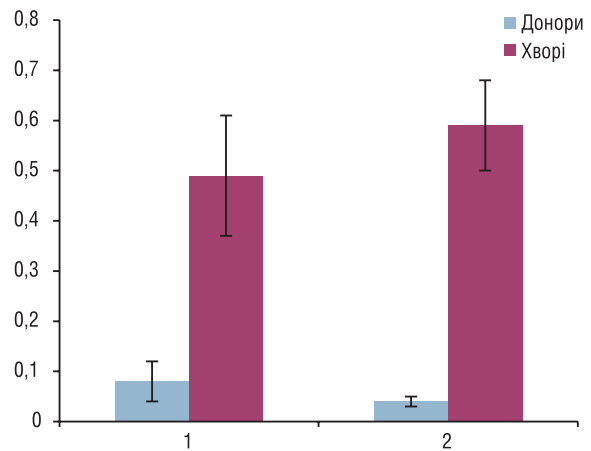


Рис. 4. Супероксид- (нМ/10⁵ клітин·хв) та NO- (нМ/10⁵ клітин) генеруюча активність нейтрофілів крові у хворих на мКРР: 1 — рівень СР; 2 — рівень NO

Таблиця 5

Активність ММП у ТП, МВ, крові та сечі хворих на мКРР

Досліджені зразки	Активність, ум. од.	
	ММП-2	ММП-9
ТП, 5 см від МВ	$3,7 \pm 0,9$	$6,6 \pm 1,7$
ТП, прилегла до МВ	$6,8 \pm 1,8^*$	$9,9 \pm 2,9^*$
МВ	$6,2 \pm 1,9^*$	$12,7 \pm 2,3^*$
Кров	$0,84 \pm 0,10^*$	$0,62 \pm 0,12^*$
Сеча	$312 \pm 48^*$	$364 \pm 63^*$

* $p < 0,05$ порівняно з печінкою на відстані 5 см від МВ.

* $p < 0,05$ порівняно з хворими категорії МО.

ММП-2 у МВ в 1,7 раза, а в прилеглий до нього ТП — у 1,8 раза вища за активність ферменту в ТП на відстані 5 см ($p < 0,05$). Активність ММП-9 в МВ майже у 2 рази перевищує цей показник у ТП на відстані 5 см, а в прилеглий до МВ печінці дещо нижча і перевищує таку в умовно здоровій ТП в 1,5 раза при недостовірній різниці ($p > 0,05$). Таким чином, найвищі показники деструкції позаклітинного матриксу (ПКМ) фіксували в МВ та на межі його інвазії в прилеглу ТП. Разом з тим навіть на відстані 5 см від МВ відмічено достатньо високі рівні протеолітичної активності, що свідчить про значні зміни в реорганізації ПКМ, які відбуваються в умовно здоровій ТП при метастатичному ураженні органа. Такі зрушен-

ня демонструють пропуклинні характеристики мікрооточення сайтів вторинного метастазування, де первинна пухлина через відповідні сигнальні шляхи створює умови для свого розповсюдження [15].

У сироватці крові та сечі здорових донорів активність обох ММП не виявлялася або визначалася на рівні значень, наближених до нульових. Активність ММП-2 у сироватці крові та сечі хворих на мКРР відповідно у 2,0 та 1,7 раза нижча за такі показники у пацієнтів із КРР категорії M0 (відповідно $1,71 \pm 0,20$ і 530 ± 65 ум. од.; $p < 0,05$). Активність ММП-9 у сироватці крові та сечі хворих на мКРР майже не відрізняється від цих показників у пацієнтів категорії M0 ($p > 0,1$). Раніше нами показано, що активність ММП-2 у пухлинній тканині хворих на рак шлунка з віддаленими М також значно нижча за активність ферменту в пухлинах хворих без М [29]. Можливо припустити, що ММП-2 первинної пухлини відіграє важливу роль на ранніх етапах метастазування, тобто при супроводі дисемінації пухлинних клітин, що знаходить відображення в інтегральних для організму показниках сироватки крові та сечі (див. табл. 5).

Роль СР та NO у печінці може бути пояснена їхніми унікальними біохімічними і регуляторними властивостями, впливом на широке коло прямих і непрямих молекулярних мішеней в якості як інгібіторів, так і агоністів клітинних функцій. Вони є потенційними медіаторами пошкодження тканин і розвитку недостатності, що може виникати в печінці після її резекції. Крім того, процеси, пов'язані зі зростанням міграції лейкоцитів із мікросудин, також можуть вносити вклад у підвищення рівнів СР і NO. СР, які генеруються в ЕТЛ мітохондрій та NOX нейтрофілів, відповідають за пряме пошкодження компонентів клітин печінки та можуть викликати апоптоз/некроз, тоді як СР, NO, генеровані NOX, iNOS нейтрофілів/фагоцитів, відповідають за редоксзалежну трансдукцію сигналу, який ініціює проліферацію [3, 30–32].

Хімічна модифікація біомолекул СР і NO може призвести до їх функціональної інактивзації, загибелі клітин або адаптивної клітинної відповіді. Попри свої потужні антиоксидантні ресурси, гепатоцити «страждають» від цитотоксичних ефектів СР і NO, що призводить до їх загибелі. У печінці запальні клітини, холангіоцити і клітини Купфера є основними джерелами TNF- α , який разом з іншими запальними цитокинами спричинює дисфункцію ЕТЛ мітохондрій та посилення генерування СР [6, 33]. Важливо зазначити, що роль TNF- α у розвитку мітохондріальної дисфункції полягає у впливі на посилення синтезу NO внаслідок індукції iNOS. NO може функціонально інактивувати FeS-білки ЕТЛ мітохондрій та потік електронів у ньому, що викликає нерегульоване генерування СР у мітохондріях [15, 17, 28]. Ці дані свідчать, що порушення функціонування дихального ланцюга є ключовою подією, яка сприяє формуванню клітинної гіпоксії та формуванню окисного фенотипу в печінці як органі віддаленого метастазування. Молекулярні порушення редокс-стану

в печінці можуть призвести до синдрому поліорганної недостатності у хворих на мКРР, яка є результатом супероксид- та NO-залежних пошкоджувальних реакцій при відповіді органа на резекцію. Встановлено кореляційні зв'язки між пошкодженням органа (кількістю видалених сегментів печінки) та рівнем NO ТП, прилеглої до МВ, з одного боку, та між активністю цитохрому P450 в ТП на відстані 5 см від М і його розміром, з іншого. Досліджені маркери можуть бути ефективними для моніторингу стану печінки при її пошкодженні під час оперативних втручань та її трансплантації.

ВИСНОВКИ

1. У тканині МВ, а також у прилеглій та на відстані 5 см ТП виявлено дефекти ЕТЛ, що є результатом дисфункції мітохондрій, порушення транспорту електронів з утворенням СР.

2. Встановлено, що тканини МВ та ТП, що його оточує, характеризуються активацією джерел генерування редокс-молекул: високі рівні СР, NO та активності ММП-2, -9 порівняно з такими самими показниками в ТП на відстані 5 см.

3. Формування метастатичного мікрооточення в печінці забезпечується СР- та NO-активацією ММП і ремоделюванням ПКМ, з одного боку, та підвищенням рівня ЛФ і накопиченням ВЗ, які є сигналом для активації проліферативних процесів в клітинах, з іншого.

4. Досліджені показники редокс-стану печінки, оперованої з приводу М КРР, можуть бути використані для оцінки функціонального стану органів та тканин віддаленого метастазування, ризиків виникнення рецидивів онкологічних захворювань та удосконалення терапевтичних підходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; **26**: 173–9.
2. Sainz RM, Lombo F, Mayo JC. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers (Basel)* 2012; **4**: 442–73.
3. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 8082–91.
4. Бурлака АП, Сидорик ЕП. Редоксзависимые сигнальные молекулы в механизмах опухолевого процесса. Київ: Наукова думка, 2014. 255 с.
5. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2015; **8**: 125–58.
6. Vidal-Vanaclocha F. The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenviron* 2008; **1**: 113–29.
7. Liang W, Ferrara N. The complex role of neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Immunol Res* 2016; **4**: 83–91.
8. Бурлака АП, Ганусевич П, Гололюк ВВ та ін. Взаємозв'язок супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів хворих на рак прямої кишки з клінічними характеристиками та вплив на віддалені результати комбінованого лікування. *Онкологія* 2016; **4**: 283–7.
9. Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, et al. Metastasis and oxidative stress: are antioxidants a metabolic driver of progression? *Cell Metab* 2015; **22**: 956–8.
10. Golse N, Bucur PO, Adam R, et al. New paradigms in post-hepatectomy liver failure. *J Gastrointest Surg* 2013; **17**: 593–605.

11. Lintoiu-Ursut B, Tulin A, Constantinoiu S. Recurrence after hepatic resection in colorectal cancer liver metastasis. *J Med Life* 2015; **8**: 12–4.
12. Hammond JS, Guha IN, Beekingham IJ, et al. Prediction, prevention and management of postresection liver failure. *Br J Surg* 2011; **98**: 1188–200.
13. Ozaki M, Todo S. Surgical stress and tumor behavior: impact of ischemia-reperfusion and hepatic resection on tumor progression. *Liver Transpl* 2007; **13**: 1623–6.
14. Kauffmann R, Fong Y. Post-hepatectomy liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014; **3**: 238–46.
15. Ortega AL, Mena S, Estrela JM. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers* 2010; **2**: 274–304.
16. Shi JH, Line PD. Effect of liver regeneration on malignant hepatic tumors. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 16167–77.
17. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К.: Наукова думка, 2006. 227 с.
18. Бурлака АП, Голотюк ВВ, Вовк АВ та ін. Маркери редокс-стану пухлин хворих на рак прямої кишки. Медична та клінічна хімія 2016; **18**: 39–44.
19. Burlaka AP, Ganusevich II, Golotiuk VV, et al. Superoxide- and NO-dependent mechanisms of antitumor and antimetastatic effect of L-arginine hydrochloride and coenzyme Q₁₀. *Exp Oncol* 2016; **38**: 31–5.
20. Бурлака АП, Ганусевич ІІ, Лук'янчук ЄВ та ін. Мітохондріальний редокс-контроль матриксних металопротеїназ та метастазування у хворих на рак молочної залози. Онкологія 2010; **4**: 377–82.
21. Ганусевич ІІ, Мамонтова ЛА, Меренцев СП та ін. Желатинази сироватки крові як маркери контролю клінічного перебігу раку шлунка. Онкологія 2015; **2**: 85–9.
22. Бурлака АП, Ганусевич ІІ, Сидорик ЄП та ін. Молекулярні механізми розвитку діабетичної мікроангіопатії. Ендокринологія 2012; **1**: 52–60.
23. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 342–55.
24. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol* 2011; **64**: 287–96.
25. Xue X, Shah YM. Intestinal iron homeostasis and colon tumorigenesis. *Nutrients* 2013; **5** (7): 2333–51.
26. Pusatcioglu CK, Nemeth E, Fantuzzi G, et al. Systemic and tumor level iron regulation in men with colorectal cancer: a case control study. *Nutr Metab (Lond)* 2014; **11**: 21.
27. Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, et al. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. *Biometals* 2010; **23**: 399–409.
28. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, et al. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 2013; **11**: 118–27.
29. Burlaka AP, Ganusevich II, Gafurov MR, et al. Stomach cancer: interconnection between the redox state, activity of MMP-2, MMP-9 and stage of tumor growth. *Cancer Microenviron* 2016; **9**: 27–32.
30. Degli Esposti D, Hamelin J, Bosselut N, et al. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. *Biochem Res Int* 2012; **2012**: 387626.
31. Lee DJ, Kang SW. Reactive oxygen species and tumor metastasis. *Mol Cells* 2013; **35**: 93–8.
32. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liaison in cancer cells. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2253.
33. Mari M, Colell A, Morales A, et al. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2010; **12**: 1295–331.

SUPEROXIDE- AND NO-DEPENDENT MECHANISMS OF FORMATION OF METASTATIC MICROENVIRONMENT DISTANT SITES OF METASTASIS IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

A.P. Burlaka, A.V. Vovk, I.I. Ganusevych,
A.A. Burlaka, S.M. Lukin, S.V. Virko

Summary. Objective: to study the peculiarities of the redox state of metastasis (M), liver tissue (LT), blood and urine of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in liver. **Object and methods:** a study of the tissue M; LT, which is in direct contact with M; LT taken at a distance of 5 cm from M; urine and blood of 25 mCRC patients with liver damage was carried out. The activity of iron-sulfur protein N-2 (FeS-protein N-2) electrontransport chain (ETC) of mitochondria, the level of lactoferrin (LF), free iron (FI) was determined by the method of electron paramagnetic resonance (77 K). The rate of superoxide radicals (SR) and nitric oxide (NO) were detected according spin trapping technique (Spin Traps). The activity of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) was registered using method of zymography in polyacrylamide gel. **Results:** in mCRC with liver M functioning of cytochrome P450 in hepatocyte detoxification system, defects in ETC of mitochondria (NO complexes with FeS-proteins — NOFeS-proteins), metabolism disorder of oxygen and iron, changing the degree of degradation of extracellular matrix. The most severe of these violations were in the LT, which is adjacent to M (plot formation of metastatic microenvironment) that manifested decreased levels of cytochrome P450, increasing levels of NOFeS-proteins complexes, LF, FI, MMP-2, -9 and speed generate CP and NO comparable to TP at 5 cm of M. In blood of patients with mCRC was found high (compared with patients without M CRC) level superoxyde- and NO-generating activity of neutrophils, active forms of gelatinases. **Conclusion:** the investigated parameters redox state of liver of patients operated on mCRC can be used to assess the functional state of organs and tissues distant M, risk of recurrence cancer and improve therapeutic approaches.

Key Words: metastatic colorectal cancer, liver, redox state of distance metastasis sites.

Адреса для листування:

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

Одержано: 01.03.2017