

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

**РАДИКАЛЫ КИСЛОРОДА ОПУХОЛЕВОЙ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ,
НЕЙТРОФИЛОВ И ТРОБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ
РАКОМ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Бурлака А.П.

д.б.н.,

ведущий научный сотрудник лаборатории проблем метастатического микроокружения Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины
arburlaka@gmail.com

Бурлака А.А.

д.м.н.,

старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела опухолей органов брюшной полости Национального института рака МЗ Украины
nir.burlaka@gmail.com

Ганусевич И.И.

д.б.н.,

заведующая лабораторией проблем метастатического микроокружения Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины
iganus2000@yahoo.com

В работе представлены данные исследований особенностей генерирования супероксидных радикалов, активности матриксных металлопротеиназ-2 и -9 клетками опухолевой и жировой тканей (ЖТ), нейтрофилами и тромбоцитами крови больных колоректальным раком. Выявлено, что накопление дисфункциональной ЖТ в организме больного способствует росту скорости генерирования супероксидных радикалов в опухоли, супероксид-генерирующей активности нейтрофилов и тромбоцитов, активности матриксных металлопротеиназ (ММП). Нарушение равновесия в редокс-состоянии нейтрофилов и тромбоцитов, гиперлипидемия и активация ММП, модифицируя микроокружение опухолевых клеток побуждает их приобретать фенотип с высокой инвазивностью и агрессивностью, способствует метастазированию путем накопления нейтрофилов и тромбоцитов с фенотипом к нерегулируемому генерированию СР и ММП.

Ключевые слова: *колоректальный рак; опухоли; жировая ткань; нейтрофилы; тромбоциты, супероксидные радикалы; матриксные металлопротеиназы*

**OXYGEN RADICALS IN TUMOR AND ADIPOSE TISSUE,
NEUTROPHILS AND PLATELETES IN PATIENTS WITH COLORECTAL
CANCER: CLINICAL SIGNIFICANCE**

Burlaka A.P.

Doctor of Biological Sciences,

*Leading Researcher, Laboratory for Problems of Metastatic Microenvironment
RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS
of Ukraine, Kyiv, Ukraine
apburlaka@gmail.com*

Burlaka A.A.

*Doctor of Medical Sciences,
Senior Researcher, Research Department of Abdominal Tumors, National
Cancer Institute, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine
nir.burlaka@gmail.com*

Ganusevich I.I.

*Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Metastatic
Microenvironment Problems RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
iganus2000@yahoo.com*

The data on the features of the generation of superoxide radicals, the activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in tumor cells and adipose tissues, neutrophils and blood platelets of patients with colorectal cancer have been presented. It was revealed that the accumulation of dysfunctional adipose tissues in the body promotes an increase in the rate of generation of superoxide radicals in the tumor, superoxide-generating activity of neutrophils and platelets, and the activity of matrix metalloproteinases (MMPs). Imbalance in the redox state of neutrophils and platelets as well as hyperlipidemia and activation of MMP could modify tumor microenvironment that in turn promotes the formation of a phenotype of high invasiveness and aggressiveness in tumor cells and facilitates metastasizing through the accumulation of neutrophils and platelets with a phenotype of unregulated generation of superoxide radicals and MMP.

Key words: Colorectal cancer; tumors; adipose tissue; neutrophils; platelets; superoxide radicals; matrix metalloproteinases

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний в мире, что может быть связано с различными факторами окружающей среды и образа жизни, такими как ожирение и низкая физическая активность [1,2]. Существует тесная связь между хроническим воспалением, вызываемым РФК, и неоплазией толстой кишки, причем степень, длительность и активность влияния РФК являются основными определяющими факторами. Опухолевые клетки при гематогенном метастазировании взаимодействуют с нейтрофилами и тромбоцитами, обеспечивая программу метастатического фенотипа, так как обладают множеством механизмов их активации. Ожирение вызывает нейтрофилию тканей, что связывают с усилением метастазирования в эти органы. Нейтрофилы в микроокружении опухоли подвергаются перепрограммированию в клетки с проопухолевым фенотипом и способностью продуцировать широкий спектр медиаторов, в

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

частности супероксидные радикалы, оксид азота и ММП [3-5]. Мы пытаемся найти подтверждение того, что, выведенные из равновесия вследствие нарушения их редокс-состояния, жировая ткань (ЖТ), нейтрофилы и тромбоциты могут представлять терапевтическую цель при гипо- или гиперактивации. Нарушение равновесия в редокс-состоянии может привести к нерегулируемой гипер- или гипоактивации тромбоцитов и тромбоэмболическим осложнениям, которые являются общим для большинства заболеваний. Контроль над этими процессами может стать стратегией управления минимизации смертности после резекции печени в условиях метастатического поражения.

Проведено исследование опухолевой, жировой ткани и крови 83 больных КРР (40 больных I - II-ой и 43 – III - IV-ой). У всех пациентов диагноз, стадию заболевания и наличие метастазов верифицированы в соответствии с требованиями доказательной медицины (в ходе соответствующих клинико-инструментальных обследований, морфологически), а также установлен уровень тромбоцитов, при этом у 22 % больных их количество составило $220 \times 10^9/\text{л}$, а у остальных определялся тромбоцитоз - $410 \times 10^9/\text{л}$. Исследовались 83 образца ткани аденокарцином, 83 образца ЖТ, отпрепарированной на расстоянии 5 см от опухоли, у больных КРР с ИМТ < 25 кг/м² (n=37) и ИМТ ≥ 25 (n= 46) кг/м², которым выполнили хирургическое лечение в Национальном институте рака. Кровь отбирали при операции в центрифужные пробирки с раствором трилона Б (3%). Больных проинформировали о проведении диагностических процедур и получили согласие на использование тканей и крови в исследовательских целях. Исследования выполняли в соответствии с принципами проведения биомедицинских исследований с согласия пациентов, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Группой сравнения были 18 больных язвенной болезнью. Из ткани опухоли и ЖТ готовили образцы для исследования редокс-состояния методом ЭПР. 250 мкл очищенной фракции тромбоцитов или нейтрофилов использовали для определения уровней скорости генерирования СР. Нейтрофилы выделяли из крови по стандартной методике на градиенте плотности фикол/верографин, а тромбоциты по методике, описанной в работе [7]. Свободные жирные кислоты (СЖК) определяли спектрофотометрически. Уровни скорости генерирования СР клетками опухоли, ЖТ, нейтрофилами и тромбоцитами определяли методом ЭПР при применении технологии SpinTraps (спиновые ловушки TEMPONE-H, ДЕТК) (Sigma, USA). Активность ММП-2 и ММП-9 определяли методом зоографии [8-11]. Статистический анализ полученных результатов проведен с использованием t-критерия Стьюдента и программы Origin7.0. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Разницу считали достоверной при $p < 0,05$. Выживаемость анализировали по методу Каплана - Мейера, используя χ^2 и log-rank критерии.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что увеличение в организме больного массы ЖТ усиливает генерирование СР в клетках опухоли внутриклеточными источниками, в частности митохондриями. Так, при норме скорости генерирования СР $0,18 \pm 0,03$ нМоль/г ткани мин. у больных с ИМТ < 25 кг/м² этот показатель равнялся $0,68 \pm 0,05$ нМоль/г ткани мин, а при увеличении ИМТ ≥ 25 кг/м² возрастает и скорость генерирования СР ($0,84 \pm 0,07$ нМоль/г ткани мин.). Избыток энергетических субстратов при ожирении приводит к усилению митохондриальной дисфункции и модификации окислительного сигналинга. ЖТ создает условия для усиленной утилизации липидов и углеводов для синтеза энергии в форме АТФ в опухоли. То есть, избыток этих веществ в клетках активизирует цепь транспорта электронов митохондрий, утилизацию кислорода и генерирование СР, что модифицирует редокс-состояние микроокружения опухолей [12-16]. У этих же больных растет и супероксид-генерирующая активность нейтрофилов ($1,42 \pm 0,02$ нМоль/10³ клеток) по сравнению с больными КРР с нормальным весом ($1,38 \pm 0,04$ нМоль/10³ клеток мин.), которая превышает контрольные значения в 7 раз (контрольные значения $0,18 \pm 0,02$ нМоль/10³ клеток мин.). Дисфункциональная ЖТ вызывает нейтрофилию легких и печени, которая ассоциируется с усилением метастазирования КРР в эти органы. Усиленное генерирование СР полиморфно-ядерными нейтрофилами в месте воспаления вызывает эндотелиальную дисфункцию и повреждение тканей. Ожирение приводит к нейтрофил-зависимому нарушению целостности сосудов из-за потери адгезии эндотелиоцитами, что способствует экстравазации опухолевых клеток в органы. Разнообразие клонов нейтрофилов и их пластичность лежат в основе потенциала опухоль-ассоциированных нейтрофилов в микроокружении опухоли. На ранних стадиях опухолевого процесса нейтрофилы обнаруживаются преимущественно на периферии опухоли и проявляют цитотоксичность к опухолевым клеткам, генерируя высокие уровни СР. В зрелых опухолях у опухоль-ассоциированных нейтрофилов эти функции понижены до уровней, обеспечивающих их проопухолевые эффекты [17-19]. Больные КРР с избыточным весом по показателю скорости генерирования СР тромбоцитами разделились на три подгруппы. Первая подгруппа (n=8) - $\leq 1,70$ нМоль/10³ клеток мин, вторая - (n=16) - $\leq 1,90$ нМоль/10³ клеток мин, а третья (n=22) - $\leq 2,10$ нМоль/10³ клеток мин. Как видно, наличие опухоли и дисфункциональной ЖТ способствует росту супероксид-генерирующей активности тромбоцитов. В тромбоцитах NOX является основным продуцентом СР, уровни которых определяют степень активации тромбоцитов. Активированные тромбоциты взаимодействуют с эндотелиальными клетками и секретируют про- и антиангиогенные факторы. СР, синтезированные тромбоцитами, в свою очередь запускают цепь образования РФК, адгезию и дифференцировку тромбоцитов в автономном аутоусиливающемся контуре. Этот порочный круг приводит к формированию у тромбоцитов фенотипа с прокоагулянтными свойствами и высокому риску

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

тромбоза. Для определения 5-летней выживаемости больных в зависимости от скорости генерирования СР тромбоцитами проводили анализ Каплана-Мейера. Из полученных данных видно, что супероксид генерирующая активность тромбоцитов у больных с избыточным весом в 17 раз выше, чем у здоровых людей ($p < 0,001$). Пятилетняя общая выживаемость для подгруппы 1 с высокой активностью составляла 39%; для подгрупп 2 и 3 - 56% и 62%, соответственно. То есть, высокая активность тромбоцитов оказывают существенное влияние на выживаемость больных КРР с ожирением. Выявленные нами изменения в редокс-состоянии опухолей, ЖТ, нейтрофилов и тромбоцитов вызывают рост уровня свободных жирных кислот (СЖК) в крови больных. Содержание СЖК в плазме крови больных КРР с ИМТ ≥ 25 кг/м² определялось на уровне 0.53 (0.38–0.63) мМоль/л по сравнению с больными КРР, у которых ИМТ < 25 кг/м² (0.34 (0.30–0.37) мМоль) и больными язвенной болезнью 0.21 (0.14–0.26) мМоль). Жирные кислоты становятся основным источником энергии для опухоли, катаболизируясь путем окисления в электронтранспортной цепи митохондрий, что является общей чертой опухолей, так же как их способность перепрограммировать метаболизм для поддержки синтеза АТФ и других макромолекул, необходимых для роста и выживания. Существует положительная корреляция между уровнем СЖК в плазме крови и ИМТ, при этом каждой дополнительной единицы роста ИМТ уровень СЖК увеличивается на 1,2% у здоровых доноров и на 3,6% у больных КРР. Нами выявлена связь между количеством тромбоцитов и активностью ММП тромбоцитов, с одной стороны, и количеством как микрометастазов, так и клинически выявленных метастазов, - с другой. Ранее нами было обнаружено, что и при отсутствии, и при наличии диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге низкие показатели активности ММП-9 тромбоцитов ассоциированы с большей трехлетней общей выживаемостью больных раком желудка категории M₀. Показано, что активность обоих желатиназ тромбоцитов крови больных мКРР как с нормальным, так и с избыточным весом, значительно превышает таковую у пациентов с язвой (в 2,3-5 раз, $p < 0,05$), которые служили группой контроля. При этом у больных КРР с ожирением активность ММП-2 и ММП-9 в 1,7 и 2,4 раза, соответственно, достоверно выше, чем такие показатели у пациентов с нормальным весом. Таким образом, высокий протеолитический потенциал тромбоцитов, обусловленный желатиназами, ассоциирован как с опухолью, так и с избыточным весом пациента. Учитывая функции желатиназ тромбоцитов, связанные с сопровождением циркулирующих диссеминированных опухолевых клеток, можно предположить их роль в усилении метастазирования и неблагоприятном течении мКРР [20-22]. У онкологических больных адипоциты претерпевают значительные морфологические и функциональные изменения, приобретая фибробластоподобный фенотип. Изменения фенотипа адипоцитов включают: 1) утрату способности синтезировать адипонектин и лептин - маркеры конечной дифференциации адипоцитов 2) митохондриальную дисфункцию

3) изменение размеров 4) перепрограммирование метаболизма на гликолиз и активацию генерирования СР. Модифицируя микроокружение опухолевых клеток, гиперлипидемия увеличивает эффективность метастазирования с помощью различных механизмов, включая накопление опухоль-ассоциированных нейтрофилов в органах и усиление генерирования СР. А снижение уровня СР в микроокружении опухолей угнетает их дифференциацию в миофибробласты. Опухоли КРР развиваются в непосредственной близости от адипоцитов и метастазируют в среде, где преимущественно преобладают адипоциты. Рост и метастазирование этих опухолей отражают важную роль адипоцитов, которые присутствуют в их микроокружении и поддерживают прогрессирование опухолей, а микроокружение клеток жировых отложений однозначно обеспечивает опухоли нишу для трансформированных клеток.

Список литературы.

1. Nicolas Golse & Petru O. Bucur & René Adam, Denis Castaing & Antonio Saunha, Eric Vibe New Paradigms in Post-hepatectomy Liver Failure. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2020, ISSN 1091-255X.- *J Gastrointest Surg*. DOI 10.1007/s11605-012-2048-6.
2. Sreevalsan S, Safe S. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2019 December; 9(4): 350– 357. doi:10.1007/s11888-013-0190-5.
3. Qureshi A, Karpen ch, Qureshi N, et al. Tocotrienols induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 58–71.
4. Burlaka, A A Burlaka, S V Virko, I I Ganusevich Molecular mechanisms of oxidation damage and liver cell dysfunction in patients with metastatic colorectal cancer. *Exp Oncol*. 2019 Dec;41(4): 328-334. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-4.13796.
5. McMurray, David A. Patten, Mary-Ellen Harper Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches/ Fiona. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Nov;24(11):2301-2310. doi: 10.1002/oby.2165.
6. Ковальчук ЛВ, Игнатъева ГА, Ганковская ЛВ. *Иммунология. Практикум: Учеб. пособ. М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 194 с.*
7. С Matsubara, Y Nishikawa, Y Yoshida, K Takamura A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase, *Anal Biochem*. 1983 Apr 1;130(1): 128-33. doi:10.1016/0003-2697(83)90659-0.
8. С.П. Корочанская, П.Г. Сторожук, И.М. Быков Учебно-методическое пособие по биологической химии. Ч. 2- Учебно-методическое для студентов медицинских вузов.- 2015 г.
9. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К: Наукова думка, 2006. 227 с.

10. Бурлака АП, Сидорик ЄП, Ганусевич ІІ Вплив антикоагулянтів на показники окисного стресу та виживаність хворих на рак прямої кишки після радикального лікування. Український журнал гематології та трансфузіології.- 2008; 2: 38–44.
11. Cooper CE, Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292:C1993–2003. [PubMed: 17329402].
12. Burlaka A.P., Burlaka A.A., Virko S.V., Ganusevich I.I Molecular mechanisms of oxidation damage and liver cell dysfunction in patients with metastatic colorectal cancer.- *Exp.Oncol.*, 2019, 41, 4, 328-334.
13. Burlaka A.P., Ganusevich I.I, Burlaka A.A., Virko S.V., Kolesnik O.O. Tumor – associated redox state in metastatic colorectal cancer. *Exp. Oncol.*-2019, 41, 2, 148-152.
14. Burlaka AP, Ganusevich II, Vovk AV, Burlaka AA, Gafurov MR, Lukin SN Redox state of adipose tissue for patients with gastric cancer and its connection with the body mass index and distance from the tumor.- *Obesity Research & Clinical Practice*, 09 Nov 2019, 14(1):34-3
15. A. P. Burlaka, A. V. Vovk, A.A. Burlaka, M. R. Gafurov, K. B. Iskhakova, S. N. Lukin Rectal cancer: redox state of venous blood and tissues of blood vessels from electron paramagnetic resonance and its correlation with the five year survival.- *BioMed Research International* 2018; Volume 2018: Article ID 4848652
16. A. Burlaka, A. Vovk, A. Burlaka, M. Gafurov, K. Iskhakova, I. Ganusevich, S. Virko, S. Lukin Redox status of a metastatic microenvironment in the liver of patients with colorectal cancer from EPR.- *Applied Magnetic Resonance*, 50(1-3), 391-402 - March 2019. <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1093-z>
17. *Thrombosis Research*, Elsevier, 2016, 139, pp.65-76. [ff10.1016/j.thromres.2016.01.006](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.01.006) ff.fhal-01455290
18. Palacios-Acedo, A.L. Mège, D. Crescence, L. Dignat-George, F.Dubois, C.Panicot-Dubois, Laurence. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Frontiers in Immunology*, 2019; 10; 1805 DOI={10.3389/fimmu.2019.01805.
19. Ганусевич І.І., Мамонтова Л.А., Ковельська А.В., Гуменюк Л.Д., Меренцев С.П. Желатинази тромбоцитів у метастазуванні та прогнозі перебігу раку шлунка. *Онкологія*, 2016; 18(2);130-136.
20. By Nicole Bona, Katie DeCicco-Skinner Obesity as a Promoter of Cancer Development and Progression Submitted:May10th2018Reviewed: July 26th 2018Published: November 5th 2018. DOI: 10.5772/intechopen.80516.
21. Takuya Sakurai, Junetsu Ogasawara, Ken Shirato, Tetsuya Izawa, Shuji Oh-ishi, Yoshinaga Ishibashi, Zsolt Radák, Hideki Ohno, Takako Kizaki, "Exercise Training Attenuates the Dysregulated Expression of Adipokines and Oxidative Stress in White Adipose Tissue", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 9410954, 12 pages, 2017.