

## МОЛЕКУЛЯРНІ ПРЕДИКТОРИ ВІДНОВЛЕННЯ ФУНКЦІЇ ПЕЧІНКИ У ХВОРИХ, ОПЕРОВАНИХ З ПРИВОДУ МЕТАСТАТИЧНОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ

О. О. Колеснік<sup>1</sup>, А. А. Бурлака<sup>1</sup>, О. В. Васильєв<sup>1</sup>, В. В. Звірич<sup>1</sup>, В. І. Дорожинський<sup>1</sup>,  
А. В. Вовк<sup>2</sup>, Л. В. Бабак<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний інститут раку МОЗ України,

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, м. Київ

## MOLECULAR PREDICTORS OF REFROVING LIVER FUNCTION IN PATIENTS OPERATED FOR METASTATIC COLORECTAL CANCER

O. O. Kolesnik<sup>1</sup>, A. A. Burlaka<sup>1</sup>, O. V. Vasyliiev<sup>1</sup>, V. V. Zvirych<sup>1</sup>, V. I. Dorozhynskiy<sup>1</sup>,  
A. V. Vovk<sup>2</sup>, L. V. Babak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Cancer Institute, Kyiv,

<sup>2</sup>Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kyiv

### Реферат

Проаналізовані результати лікування 15 хворих з приводу метастатичного колоректального раку (мКРР) з ураженням печінки, яким виконане хірургічне втручання в період 2015 – 2016 рр.

За результатами дослідження, в тканинах кулки печінки виявлене функціональне виснаження детоксикаційної спроможності гепатоцитів. Рівень окисненої та низькоспінової форм цитохрому P-450 в каталітичному циклі системи детоксикації становив відповідно  $(0,33 \pm 0,08)$  та  $(1,11 \pm 0,13)$  відн. од., у нормі  $(0,59 \pm 0,03)$  і  $(2,56 \pm 0,02)$  відн. од.; FeS-білка N-2 в цьому електротранспортному комплексі –  $(0,32 \pm 0,06)$  відн. од., у нормі  $(0,61 \pm 0,09)$  відн. од. В гепатоцитах кулки печінки відзначали переформування метаболізму мітохондрій з окисного фосфорилування на гліколіз, наслідком чого є формування клітинної гіпоксії та підвищення рівня лактату і супероксидних радикалів (СР). Оцінка ступеня гострої печінкової недостатності (ГПН) після операції можлива шляхом визначення рівня лактату, активності цитохрому P-450, утворення комплексів NO з FeS-білками в електротранспортному ланцюгу (ЕТЛ) мітохондрій, швидкості генерування СР.

**Ключові слова:** колоректальний рак; метастази у печінці; хірургічне лікування; молекулярні предиктори відновлення функції печінки.

### Abstract

The results of the treatment of 15 patients for metastatic colorectal cancer with liver lesion, which were surgically interfered during the period 2015 – 2016, were analyzed. According to the results of the study, in liver stump tissues revealed a functional exhaustion of the detoxication capacity of hepatocytes. The level of oxidized and low-spin forms of cytochrome P-450 in the catalytic cycle of the detoxication system was respectively  $(0.33 \pm 0.08)$  and  $(1.11 \pm 0.13)$  unit, in norm  $(0.59 \pm 0.03)$  and  $(2.56 \pm 0.02)$  unit; FeS-protein N-2 in this electron transport complex –  $(0.32 \pm 0.06)$  unit, normal  $(0.61 \pm 0.09)$  unit. In liver stump hepatocytes, reprogramming of the mitochondria metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis was observed, resulting in the formation of cell hypoxia and increased levels of lactate and superoxide radicals (SR). Evaluation of the degree of acute liver failure after surgery is possible by determining the level of lactate, the activity of cytochrome P-450, the formation of complexes of NO with FeS-proteins in the electron transport chain of mitochondria, the rate of generation of SR.

**Keywords:** colorectal cancer; liver metastases; surgical treatment; molecular predictors of liver function recovery.

В печінці функціонує механізм специфічного відновлення попереднього об'єму та функцій через короткий період з моменту її резекції чи пошкодження. Регенерація органа відбувається після резекції чи трансплантації печінки, а також її токсичного ураження. Процес регенерації печінки включає гіперплазію всіх типів клітин органа. Реплікація гепатоцитів запускається з моменту виконання "великої" резекції печінки, а непаренхіматозних клітин (ендотеліальних, зірчастих ретикулоендотеліоцитів, клітин жовчних про-

ток) – активується дещо пізніше [1].

Інтенсивні дослідження щодо регенерації печінки проведені в останні два десятиліття, проте, механізми, що відповідають за відновлення об'єму печінки, не встановлені. У печінці підтримується чіткий баланс між зменшенням та збільшенням об'єму паренхіми шляхом регулювання процесів росту. Результати клінічних та експериментальних досліджень з вивчення патофізіології оперованої печінки не розкривають процеси формування ГПН та регенерації [2]. Патологічний ефект хірургічно-

го прийому ішемії-реперфузії (маневр Прингла) є причиною пошкодження печінки та виникнення ГПН після операції у пацієнтів, оперованих з приводу онкологічних захворювань, як "великої" резекції, так і трансплантації органа. Незважаючи на актуальність проблеми, більшість патологічних процесів, що супроводжують ці стани, недостатньо досліджені.

Метою дослідження є вивчення механізмів пошкоджуючого впливу резекції печінки, оцінка функціонального стану залишкової ткани-

ни печінки та пошук шляхів впливу на процеси регенерації оперованої печінки, що у майбутньому дозволить зробити хірургію безпечнішою. Розуміння механізмів регенерації печінки дозволить коригувати та попереджати гострі стани при токсичному чи інфекційному ураженні органа.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Проаналізовані результати лікування 15 хворих, яким з приводу мКРР з ураженням печінки виконали хірургічне втручання у 2015 – 2016 рр. (див. таблицю). Пацієнти отримували хіміотерапію згідно з затвердженими міжнародними та вітчизняними стандартами, а також клінічними протоколами на період проведення досліджень.

Протокол хірургічного втручання включав проведення інтраопераційного ультразвукового дослідження печінки, дотримання принципів анатомічної резекції органа. Структури воріт печінки обробляли за методом Extra–Glissonian approach. Паренхіму печінки розсікали з використанням методики Clamp–crush, ультразвукового дисектора, моно– і біполярного коагуляторів.

Зразки паренхіми кукси печінки забирали під час та не пізніше ніж через 1 год з моменту завершення резекції. Вміст лактату в тканині печінки визначали за даними спектрофотометрії. Стан детоксикаційної функції гепатоцитів, спряження біологічного окиснення та фосфорилування в мітохондріях визначали за методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) при температурі рідкого азоту. Для цього 500 мг тканини печінки вміщували у спеціальну прес–форму і заморожували в рідкому азоті. Отримані зразки досліджували на комп'ютеризованому спектрометрі ЕПР PE–1307. Якісні і кількісні зміни функціонування електронотранспортного ланцюга мітохондрій визначали за розташуванням сигналів ЕПР (g–фактор спектроскопічного розщеплення), також вимірювали амплітуду відповідного сигналу в контрольних і дослідних зразках тканин. Досліджували стан FeS–білків в першому електронотранспортному комплексі ЕТЛ мітохондрій (g–фактор 1,94); рівень флавоубісеміхінону в ЕТЛ мітохондрій (g–фактор 2,00); динаміку формування комплексів NO з FeS–білками в ЕТЛ мітохондрій N–типу (g–фактор 2,03); динаміку формування структурних змін в ЕТЛ

мітохондрій з формування триплетного сигналу (g–фактор 2,007). Стан системи детоксикації в гепатоцитах оцінювали за активністю цитохрому P–450 (g–фактор 2,25 і 2,42).

Статистичний аналіз даних проводили в пакеті SPSS Statistics. Нормальність розподілу змінних перевіряли за тестом Шапіро–Вілка. За критичний рівень значущості під час перевірки статистичних гіпотез приймали  $p = 0,05$ . Оскільки більшість параметрів мали розподіл, відмінний від нормального, для опису вибіркового розподілу визначали медіану (Me), нижній (25%) і верхній (75%) квартилі: Me [25%; 75%].

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Гепатоцити дуже чутливі до ішемічних умов існування. Ішемія–реперфузія часто є одним з основних факторів виникнення ГПН при “великій” резекції печінки, особливо за нормометричної ішемії. Більшість патологічних змін, що виникають в гепатоцитах за умов аноксії, виявляють саме в мітохондріях. Порушення метаболізму кисню в дихальному ланцюгу мітохондрій спричиняє зміни транспорту електронів та дихання мітохондрій. За таких умов значно зменшується продукування піримідинових нуклеотидів, що зумовлює збільшення накопичення внутрішньоклітинного NADH/NAD<sup>+</sup>. Зміни процесів окисного фосфорилування зумовлюють активацію деплеції внутрішньоклітинного АТФ, прискорення гліколізу, збільшення рівня лактату, впливу H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> та Ca<sup>2+</sup> на гомеостаз. Ці патологічні зміни спричиняють тяжкі розлади функції гепатоцитів і печінки в цілому після операції.

В свою чергу, реперфузія зумовлює пошкодження клітин продуктами неповного відновлення кисню радикальними формами кисню (РФК), зокрема, супероксидними радикалами при повторному надходженні кисню в ішемізовані тканини. РФК продукуються як в середині клітин (мітохондріями) так і позаклітинними джерелами (NOX, iNOS нейтрофільних гранулоцитів, тромбоцитів, лімфоцитів) [3].

За результатами дослідження в тканинах кукси печінки виявлене виснаження детоксикаційної спро-

**Характеристика хворих**

Показник	Величина показників
Локалізація первинної пухлини (пряма кишка/ободова кишка)	3/12
Одномоментна/двохетапна резекція	2/13
Синхронні/метахронні метастази в печінці	1/14
Метастази іншої локалізації на момент резекції печінки	4
легені	3
черевна порожнина	1
ПХТ до операції на печінці, кількість курсів	14
FOLFOX-6, 3 і менше	4
FOLFOX-6, більше 3	3
XELOX, 3 і менше	2
XELOX, більше 3	3
FOLFIRI, 3 і менше	2
Стан хворого за шкалою ASA	
I - II	11
III	3
Кількість видалених сегментів печінки	
3 і менше	2
більше 3	12
Тривалість ішемії-реперфузії, хв ( $\bar{x} \pm m$ )	31,2 ± 9,6
Тривалість оперативного втручання, хв ( $\bar{x} \pm m$ )	154,8 ± 19,2

можності гепатоцитів. Активність окисненої та низькоспінової форм цитохрому P-450 в каталітичному циклі системи детоксикації становила відповідно ( $0,33 \pm 0,08$ ) та ( $1,11 \pm 0,13$ ) відн. од., у нормі ( $0,59 \pm 0,03$ ) і ( $2,56 \pm 0,02$ ) відн. од.

Мітохондрії цих клітин функціонують при порушенні спряження окиснення з фосфорилуванням в NADH-убіхіноноксидоредуктазі. Рівень FeS-білка N-2 в цьому електротранспортному комплексі становив ( $0,32 \pm 0,06$ ) відн. од., у нормі ( $0,61 \pm 0,09$ ) відн. од.

Також відзначали збільшення утворення комплексів NO-FeS-білків до ( $0,33 \pm 0,08$ ) відн. од., у нормі ( $0,14 \pm 0,07$ ) відн. од. Вважаємо, що такі зміни є причиною порушення енергетичної функції мітохондрій та формування клітинної гіпоксії, що корелює з збільшенням вмісту лактату в тканині куки печінки понад 2 мкмоль/г тканини, в нормі ( $1,80 \pm 0,26$ ) мкмоль/г тканини, і підтверджує функціонування гепатоцитів в умовах гіпоксії.

Провідну роль в регулюванні метаболізму в міжклітинному матриксі паренхіми печінки відіграють CP. Це редокс-залежні молекули, що активно регулюють перебіг патологічних процесів. Такі властивості CP можуть змінюватись в динаміці патологічних процесів, як і структура міжсистемної взаємодії. CP не тільки мають цитотоксичні властивості, а й можуть бути вторинними месенджерями, брати участь у підтримці фізико-хімічних властивостей біологічних мембран, регуляції внутрішньоклітинних редокс-систем, активності протеїнкіназ та проліферації, диференціюванні, апоптозі. В останні роки за даними експериментальних та клінічних досліджень доведена важливість CP та їх ключова роль при регулюванні міжклітинного матриксу та активності матриксних металопротеїназ. Процеси регулювання біологічних структур CP є циклічними, порушення мікроциркуляції та транскапілярного обміну зумовлюють тканинну гіпоксію, активують деякі ангиогенні чинники, металопротеїнази (ММП-2, ММП-9), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , що визначає баланс анти- і прозапальних цитокінів.

Мітохондрії контролюють продукцію енергії, метаболізм, акти-

вацію запрограмованої клітинної смерті, а також деякі специфічні функції клітини, зокрема, сигналізацію, синтез важливих біомолекул. Нормалізація функції мітохондрій має вирішальне значення для функціонування і виживання клітин, а її дисфункція спричиняє патологічні стани. Дисфункція мітохондрій є ключовою проблемою у формуванні поліорганної недостатності в оперованих хворих на тлі невідкладних станів та при проведенні інтенсивної терапії. Проте, є дві основні причини, чому цей факт не отримав адекватної оцінки клініцистів. По-перше, основні результати щодо дисфункції мітохондрій в клітинах органів, сприйнятливих до пошкодження мітохондрій (печінка, нирки, серце, легені, кишечник, головний мозок), отримані в моделях на тваринах. По-друге, немає чіткої терапевтичної стратегії щодо корекції порушення функції цих органел. Мітохондрії відіграють вирішальну роль у регулюванні загибелі клітин шляхом апоптозу, особливо гепатоцитів. Активація рецептору смерті індукуює апоптоз за участю каспази-8 шляхом порушення мембранних FeS-білків, мітохондрій, інактивації потоку електронів в ланцюзі транспорту електронів (ЕТЛ), що спричиняє нерегульоване генерування в мітохондріях CP і утворення апоптосом.

Ці дані свідчать, що дефекти в дихальному ланцюзі та надмірна кількість вільних жирних кислот є ключовими факторами при ішемії/реперфузії після резекції печінки.

Дисфункція мітохондрій прогресує у міру збільшення генерування CP, що ініціюють формування самопосилоючого циклу утворення радикалів внаслідок перекисного окиснення ліпідів та пригнічують комплекси I/IV електротранспортного ланцюга. З іншого боку, CP пошкоджують ДНК мітохондрій та FeS-білки дихального ланцюга, що зумовлює хронічне пошкодження органел. Підвищення рівня вільних жирних кислот в оперованій печінці активує цитохром P-450 в гепатоцитах (ізоформи CYP2E1 і CYP4A10/4A14), його участь в їх окисненні зумовлює збільшення генерування CP та прогресування дисфункції мітохондрій.

Сигнальні шляхи регенерації та їх вплив на ріст і метастазування пухлин. Повторне метастатичне ураження оперованої печінки є однією з основних проблем хірургії, оскільки виникає у 40 – 60% хворих за МКРР [4]. Розширена резекція печінки з приводу метастазів раку травного каналу супроводжується ризиком активації неконтрольованого росту пухлини у деяких хворих [3, 5].

За нормальних умов гепатоцити не діляться і перебувають у фазі G0. Після резекції або за токсичного ураження печінки вони входять у фазу G1. Такі зміни активуються шляхом зв'язування з рецепторами клітин печінки фактору некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) та інтерлейкіну-6 (IL-6), що вивільняється зірчастими ретикулоендотеліоцитами. Декілька молекулярних структур відповідають за активацію фактору росту гепатоцитів (HGF), ініціюючи перехід клітин з фази G1 у фазу S, зокрема, епідермальний фактор росту (EGF) та трансформуючий фактор росту- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). Ці фактори стимулюють реплікацію ДНК і мітоз, взаємодіючи з відповідними рецепторами. Доведено, що TGF- $\beta$ 1 пригнічує проліферацію гепатоцитів, тоді як в нормі фактор росту TGF- $\beta$  має агоністичні ефекти. На початкових етапах регенерації сигнали HGF інтенсивніші, ніж TGF- $\beta$ , а в кінцевих стадіях регенерації відновлюється початковий баланс [1 – 3]. Фактор резекції печінки є потужним стимулом до її регенерації.

В останні роки з'явилися експериментальні дані на підтвердження того, що ефект ішемії/реперфузії може спричинити активацію росту "прихованих" мікротастазів в печінці після її резекції [3]. Ініціація та прогресування росту пухлини в печінці – це багатофакторний молекулярний процес, що включає складні сигнальні шляхи, зокрема, RAS/RAF-MAPK, фосфатидилінозитол-3 кіназу (PI3K)/AKT, WNT/ $\beta$ -катенін, інсуліноподібний фактор росту (IGF), HGF/c-MET, фактори росту, що активують шляхи ангиогенезу. Клітинні та молекулярні зміни у хворих після резекції печінки (відповідь на хірургічний стрес, пошкодження внаслідок ішемії-реперфузії) можуть ініціювати ріст пухлини та його швидке прогресування [6]. Молекулярні

фактори, що продукуються в тканині печінки внаслідок хірургічного стресу, можуть відігравати роль потужного стимулу росту пухлини. Пострезекційна регенерація печінки активується мікрооточенням, різними факторами росту, цитокінами, що відповідають за ріст та активацію пухлини (проліферацію, міграцію, неоангіогенез) [6]. Під час проліферації гепатоцитів відбуваються ендокринні, аутокринні та паракринні процеси, що також можуть стимулювати «сплячі» мікрометастази та ріст пухлини [6]. Одним з основних результатів хірургічного втручання в зоні кукси печінки є швидке виділення CP, NO, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF, EGF, IL-6, ангіогенних факторів, що модифікують мікрооточення «сплячих» клітин пухлини та стимулюють її агресивний ріст і метастазування. Ріст пухлини – це баланс між концентрацією факторів росту і цитокінів в мікрооточенні клітин, стимуляції неоангіогенезу [3, 6]. Інгібітори ангіогенезу, білки позаклітинного матриксу та їх фрагменти виконують роль стабілізаторів стану “спокою” клітин пухлини.

В цьому контексті також лежить проблема виникнення ГПН після резекції печінки в 1,2 – 32% спостере-

жень, залежно від критеріїв відбору хворих, та обсяг оперативного втручання [4]. Метаболічні та функціональні зміни, в тому числі ГПН, після резекції печінки є унікальними і часто стають критичною перешкодою для реаніматологів та онкологів–хірургів як в ранньому післяопераційному періоді, так і в більш пізній строки. Резекційний стрес є потужним імпульсом до регенерації печінки, регуляції її об'єму та росту, а також атрофії [7]. В свою чергу, гемодинамічні зміни безпосередньо після резекції печінки потенціюють дію резекційного стресу, стимулюють генерування CP та NO, які, в свою чергу, активують сигнальні каскади регенерації печінки. Застосування повного чи часткового маневру Прингла під час “великої” резекції печінки забезпечує зменшення крововтрати. Проте, ефект ішемії/реперфузії, що супроводжує таку хірургічну тактику, може активувати деструктивні каскади молекулярних реакцій, медіаторами яких є CP, генеровані під час реперфузії з молекул O<sub>2</sub>, до ішемізованих тканин печінки [2]. Отже, регенерація клітин печінки в ранньому післяопераційному періоді може бути стимулом до активації росту малих прихованих депозитів

пухлин, які неможливо виявити за допомогою стандартних методів обстеження хворих в клініці.

## ВИСНОВКИ

1. У залишковій тканині печінки виявлене зменшення ефективності функціонування системи детоксикації та енергозабезпечення гепатоцитів. В гепатоцитах кукси печінки відбувається перепрограмування метаболізму мітохондрій з окисного фосфорилування на гліколіз, наслідком чого є формування клітинної гіпоксії, підвищення рівня лактату і CP.

2. Оцінка ступеня ГПН після операції можлива шляхом визначення рівня лактату, активності цитохрому P-450, утворення комплексів NO з FeS-білками в електронотранспортному ланцюгу мітохондрій та швидкості генерування CP.

3. Застосування інноваційних технологій може змінити стратегію терапії при ГПН та синдромі малої печінки. Особливу увагу слід приділити механізмам, що спричиняють загибель клітин і дисфункцію органів, а також перспективним терапевтичним стратегіям, спрямованим на відновлення функції мітохондрій.

## ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176:2–13.
2. Duncan AW. Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18:197–202.
3. Brandt HH, Nißle V, Croner RS. The influence of liver resection on intrahepatic tumor growth. *J Vis Exp.* 2016;9(110):379–81.
4. Ribeiro HS, Costa WL, Diniz AL, et al. Extended preoperative chemotherapy, extent of liver resection and blood transfusion are predictive factors of liver failure following resection of colorectal liver metastasis. *Eur J Surg Oncol.* 2013;39:380–5.
5. Burlaka AA, Lukashenko AV, Volk MO, Pryimak VV, Zhukov YuO, Kolesnik OO. Hostra pechinkova nedostatnist ta yii upravlinnia v ranomomu pisliaoperatsiinomu periodi. *Klinichna khirurgiia.* 2016;(5):34–7. [In Ukrainian].
6. Navarro-Freire F, Navarro-Sanchez P, Miron-Pozo B, et al. Recurrence of liver metastases from colorectal cancer and repeat liver resection. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;12:732–9.
7. Clavien PA, Petrowsky H. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *New Engl J Med.* 2007;356:1545–59.