

А.П. Бурлака<sup>1</sup>  
 І.І. Ганусевич<sup>1</sup>  
 А.В. Вовк<sup>1</sup>  
 В.В. Голотюк<sup>2</sup>  
 С.М. Лукін<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

<sup>2</sup>Івано-Франківський Національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

**Ключові слова:** супероксидні радикали, мітохондрії, оксид азоту, жирова тканина, рак прямої кишки.

## РЕДОКСЗАЛЕЖНІ МЕХАНІЗМИ ЗАПАЛЕННЯ В ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

Дослідження участі злоякісного новоутворення у зміні метаболізму прилеглої до пухлини жирової тканини (ППЖТ) є важливими для розуміння складних взаємовідносин між пухлиною та жировою тканиною (ЖТ), які спричиняють прогресування захворювання. Джерелом пошкоджувального впливу на ЖТ можуть бути мітохондріальні супероксидні радикали (СР) і NO<sup>\*</sup> пухлини, які здатні сприяти прогресуванню останньої за рахунок активізації в ній редоксзалежних шляхів. З огляду на те, що ЖТ є важливим джерелом енергії для клітин пухлини, розуміння механізму метаболічного симбіозу пухлинних клітин із ЖТ може стати підґрунтям для створення нових терапевтичних підходів. **Мета:** дослідити редоксзалежні механізми в нормальній ЖТ (НЖТ) пацієнтів без онкологічних захворювань, ППЖТ і ЖТ, взятій на відстані 3 см від пухлини (ЖТВ), у хворих на рак прямої кишки (РПК) та активність матриксних металопротеїназ (ММП)-2 і -9 у цих тканинах, а також вплив на них TNF-α. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на 46 зразках ППЖТ та 26 зразках ЖТВ хворих на РПК II–III стадії (pT2–3pN0–2pM0). Як контроль використали НЖТ 11 практично здорових людей, одержану після виконання ліпосакції у спеціалізованому медичному центрі з дотриманням стерильності. Серед обстежених хворих кількість жінок та чоловіків становила 21 та 25 відповідно, середній вік —  $64,0 \pm 1,6$  року. Використано методи електронного парамагнітного резонансу при температурі рідкого азоту та технології Spin Traps, зимографії в поліакриламідному гелі, біохімічні, статистичні методи. **Результати:** впливаючи на електронтранспортний ланцюг (ЕТЛ) мітохондрій ППЖТ, зокрема на Комплекс I, пухлина спричинює зростання швидкості генерування СР та, відповідно, окисних модифікацій ДНК у ППЖТ. Рівні генерування СР та окисно-індукованих мутацій ДНК у мітохондріях останньої відповідно у 6,1 і 5,8 рази вищі порівняно з НЖТ ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) та в 3,7 і 3,5 рази перевищують такі в ЖТВ ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ). Активність желатиназ ММП-2, -9 ППЖТ достовірно вища, ніж НЖТ. Виявлено достовірний вплив *in vitro* TNF-α на мітохондрії ЖТВ і ППЖТ (але не НЖТ), що проявляється зростанням клітинної гіпоксії, швидкості генерування СР, активності желатиназ. **Висновки:** під дією чинників злоякісної пухлини формується пропухлинний фенотип ППЖТ, який характеризується високими рівнями СР, окисних модифікацій ДНК та активності ММП. Інкубація НЖТ, ЖТВ і ППЖТ із прозапальним цитокіном TNF-α викликає зміни редокс-стану мітохондрій та активацію низки факторів запалення (СР, NO<sup>\*</sup>, ММП) лише в тканинах, де вже відбулося перепрограмування метаболізму під впливом пухлини, — у ППЖТ і децю меншою мірою у ЖТВ.

### ВСТУП

Рак, у тому числі рак прямої кишки (РПК), є однією з причин зростання смертності в розвинених країнах світу. Серед відносно широко обговорюваних причин підвищення ризику розвитку РПК виділяють ожиріння, частота якого зростає. Глобальна епідемія ожиріння безпосередньо впливає на частоту розвитку онкологічних захворювань: так, підвищення ризику розвитку злоякісної пухлини на 7% пов'язане зі збільшенням індексу маси тіла (ІМТ) на 2,4 одиниці. Сучасні епідеміологічні дослідження показують, що надмірна маса тіла й ожиріння є причиною 14% всіх випадків смерті від онколо-

гічних захворювань серед чоловіків, 20% — серед жінок [1]. Відомо, що існує причинно-наслідковий зв'язок між ожирінням і раком [2, 3], але механізми, які відповідають за це, не з'ясовані. Однак вивчення таких механізмів може стати основою для розробки більш ефективних терапевтичних стратегій боротьби з ожирінням і РПК.

На сьогодні ожиріння вважається хронічним запальним захворюванням, а чинники останнього — додатковим пошкоджувальним фактором при порушенні обміну речовин. З іншого боку, хронічне запалення визнається як етіопатогенетичний фактор розвитку деяких форм раку епітеліального похо-

дження (зокрема, є докази стосовно раку стравоходу, печінки, товстої кишки, молочної залози в постменопаузі та раку ендометрія) [1, 4]. Таким чином, гіпертрофована і дисфункціональна жирова тканина (ЖТ) при ожирінні характеризується прозапальним фенотипом [1–6]. Супероксидні радикали (СР), які генеруються адипоцитами, та наявність вільних ліпідів, виділених адипоцитами в пухлинне мікрооточення, сприяють адгезії, міграції та інвазії пухлинних клітин і підтримують прогресування пухлини та її неконтрольований ріст. Однією з чутливих мішеней до пошкоджувального впливу пухлини при ожирінні є мітохондрії адипоцитів [7, 8]. Відомо, що рівні прозапального цитокіну — сироваткового фактора некрозу пухлин (tumor necrosis factor  $\alpha$  — TNF- $\alpha$ ) збільшуються при ожирінні і зменшуються із втратою маси тіла. TNF- $\alpha$  сприяє системній відповіді при гострій фазі запалення, через вивільнення цілої низки інших прозапальних молекул [9].

Зважаючи на вищевикладене, метою нашої роботи було дослідити редоксзалежні механізми в нормальній ЖТ (НЖТ) пацієнтів без онкологічних захворювань і ЖТ хворих на РПК, прилеглий до пухлини (ППЖТ) і на відстані 3 см від неї (ЖТВ), активність матриксних металопротеїназ (ММП)-2 і -9 у цих тканинах, а також вплив на них TNF- $\alpha$ .

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 46 зразках ППЖТ і 26 зразках ЖТВ хворих на РПК II–III стадії (pT2–3pN0–2pM0). Серед обстежених кількість жінок та чоловіків становила 21 та 25 відповідно, середній вік —  $64,0 \pm 1,6$  року. Пацієнти перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. У 26 із них була верифікована аденокарцинома помірного ступеня диференціювання, у 20 — низького. Як контроль використали НЖТ 11 практично здорових людей, взяту після виконання ліпосакції у спеціалізованому медичному центрі з дотриманням стерильності. Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень, що викладені в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації, за інформованою згодою пацієнтів.

1 г ЖТ гомогенізували з використанням подрібнювача з отворами сітки діаметром 0,2 мм. Для дослідження впливу *in vitro* TNF- $\alpha$  на мітохондрії адипоцитів до отриманого жирового гомогенату додавали 1 мл фізіологічного розчину хлориду натрію, в якому було 3 мкг TNF- $\alpha$  (Sigma, USA), перемішували скляною паличкою та інкубували 1 год в термостаті при температурі 36 °С. З гомогенатів ЖТ (інактивних та інкубованих з TNF- $\alpha$ ) готували зразки для дослідження методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). Рівні генерування СР та NO вимірювали за технологією Spin Traps (уловлювача радикалів) [10]. Для вимірювання рівнів комплексів NO-FeS-білків та активності Комплексу I електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохон-

дрій методом ЕПР із ЖТ готували зразки за допомогою спеціальної прес-форми та низькотемпературної стабілізації. Рівні комплексів NO-FeS-білків та активності Комплексу I ЕТЛ у мітохондріях реєстрували методом ЕПР при температурі рідкого азоту (77 К) у парамагнітно чистому кварцовому дьюарі. Спектри ЕПР реєстрували при температурі 77 К. Одночасно зі спектрами досліджуваних зразків знімали спектр незалежного стандарту інтенсивності, в ролі якого використано спеціально орієнтований монокристал рубіну з відомою кількістю парамагнітних центрів [10]. Інтенсивність стандарту прийнято за 1 відн. од. вимірювань.

Молекулярний маркер окисного пошкодження ДНК — 8-oxoG — визначали методом аналізу ультрафіолетових спектрів елюатів після їх твердофазної екстракції із ЖТ. Окиснений продукт гуаніну екстрагували із ЖТ на колонці твердофазної екстракції («Merck», Німеччина) [7].

Активність ММП-2 і -9 у ЖТ визначали методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину як субстрата) на основі SDS-електрофорезу білків [5].

Статистичну обробку отриманих результатів проведено з використанням t-критерію Стьюдента та кореляційного аналізу за Спірманом в програмі Origin 7.0. Дані представлено у вигляді середнього та стандартного відхилення ( $M \pm SD$ ). Різницю вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Редокс-стан пухлини визначає напрям змін у функціонуванні клітин, не тільки прилеглих до неї, а й віддалених, зокрема кісткового мозку [11]. У цій роботі ми намагалися з'ясувати взаємозалежність між пухлиною та ЖТ. На рис. 1 наведено дані досліджень швидкості генерування СР мітохондріями в досліджуваних зразках ЖТ до та після впливу на них *in vitro* TNF- $\alpha$ . Контакт пухлини з ППЖТ хворих на РПК викликає в її клітинах зростання швидкості генерування СР мітохондріями до значень  $0,67 \pm 0,09$  нМ/г сирової тканини·хв, що в 3,7 раза вище порівняно з ЖТВ, взятою на відстані 3 см від контакту, —  $0,18 \pm 0,03$  нМ/г сирової тканини·хв ( $p < 0,05$ ) та в 6,1 раза порівняно з НЖТ —  $0,11 \pm 0,02$  нМ/г сирової тканини·хв ( $p < 0,05$ ). Отже, рівень СР найбільшою мірою зростає в мітохондріях адипоцитів ППЖТ, що свідчить про пошкоджувальний вплив новоутворення на ЕТЛ.

Під впливом TNF- $\alpha$  швидкість генерування СР у мітохондріях адипоцитів ППЖТ достовірно зростає (в 1,8 раза вище вихідного рівня;  $p < 0,05$ ) і становить  $1,20 \pm 0,21$  нМ/г сирової тканини·хв, що у 7,5 та у 4,6 раза вище, ніж в інкубованих з TNF- $\alpha$  НЖТ і ЖТВ, —  $0,16 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ) та  $0,26 \pm 0,05$  нМ/г сирової тканини·хв ( $p < 0,05$ ) відповідно (див. рис. 1). Тобто, в ППЖТ виявлено регуляторний вплив цитокіну на ЕТЛ через посилення взаємодії електронів

із киснем і, як наслідок, зростання швидкості генерування СР, що є системною відповіддю на запалення.

Вплив пухлини на редокс-стан ППЖТ супроводжується зростанням в адипоцитах рівнів точкових мутацій — пошкодження гуаніну з утворенням 8-охоG у ДНК (рис. 2). Рівень 8-охоG у ДНК НЖТ становить  $0,16 \pm 0,02$  нМ/г сирової тканини, що в 1,7 раза нижче від показників у ЖТВ —  $0,27 \pm 0,04$  нМ/г сирової тканини ( $p < 0,05$ ). Вміст 8-охоG у ДНК ППЖТ ( $0,94 \pm 0,11$  нМ/г сирової тканини) в 3,5 раза перевищує значення у ЖТВ ( $p < 0,05$ ). Інкубація зразків досліджуваних тканин із TNF- $\alpha$  супроводжується зростанням швидкості окиснення гуаніну в ДНК адипоцитів, що корелює з підвищенням рівнів СР ( $r = 0,53$ ,  $p < 0,05$ ). У НЖТ рівень 8-охоG становить  $0,21 \pm 0,05$  нМ/г сирової тканини, у ЖТВ —  $0,27 \pm 0,04$ , у ППЖТ цей показник досягає максимальних значень —  $1,18 \pm 0,20$  нМ/г сирової тканини, в 1,5 раза перевищуючи значення в ЖТВ ( $p < 0,05$ ). Важливо, що в ЖТВ і ППЖТ ці значення достовірно перевищують вихідні рівні ( $p < 0,05$ ). Тобто у ППЖТ і ЖТВ проявляється пропухлинний вплив цитокіну. Окисно-індуковані точкові мутації локалізовані в асоціатах генів, які кодують мітохондріальні комплекси, відповідальні за транспорт електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій [8–12].

На рис. 3 наведено результати дослідження комплексів NO-FeS-білків у НЖТ, ЖТВ і ППЖТ. Пошкоджувальний вплив РПК на ЕТЛ мітохондрій клітин ППЖТ проявляється зростанням рівнів цих комплексів до значень  $0,43 \pm 0,06$  відн. од. при порівнянні з НЖТ і ЖТВ, в яких зазначені показники становлять відповідно  $0,11 \pm 0,02$  та  $0,18 \pm 0,05$  відн. од. ( $p < 0,05$ ). Вплив TNF- $\alpha$  призводить до подальшого зростання рівнів комплексів NO-FeS-білків у ППЖТ до  $0,81 \pm 0,08$  відн. од., що достовірно (в 1,9 раза;  $p < 0,05$ ) вище від вихідного рівня та в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) більше порівняно з ЖТВ після інкубації з цитокіном ( $0,39 \pm 0,06$  відн. од.). У ЖТВ вміст комплексів NO-FeS-білків також достовірно (у 2,2 раза;  $p < 0,05$ ) підвищився порівняно з початковим рівнем. У НЖТ зазначений показник при інкубації з TNF- $\alpha$  майже не змінюється і становить  $0,14 \pm 0,03$  відн. од. ( $p < 0,05$ ), що може свідчити про можливість реалізації ефектів TNF- $\alpha$  лише щодо перепрограмованого ЕТЛ мітохондрій адипоцитів, які вже залучені до процесу пухлинного росту, тобто адипоцитів ППЖТ і ЖТВ. Таким чином, отримані нами результати співвідносяться з даними літератури про вплив TNF- $\alpha$  на перепрограмування мітохондрій (утворення комплексів NO-FeS-білків), генерування СР, зростання рівнів точкових мутацій (8-охоG), запальну реакцію, апоптоз по мітохондріальному шляху та метаболізм ліпідів у ЖТ [9].

Активність Комплексу I ЕТЛ мітохондрій у НЖТ і ЖТВ становить  $0,76 \pm 0,09$  та  $0,83 \pm 0,13$  відн. од. відповідно, що в 5,8 ( $p < 0,05$ ) та 6,4 ( $p < 0,05$ ) раза відповідно (рис. 4) вище значень у ППЖТ —  $0,33 \pm 0,02$  відн. од.

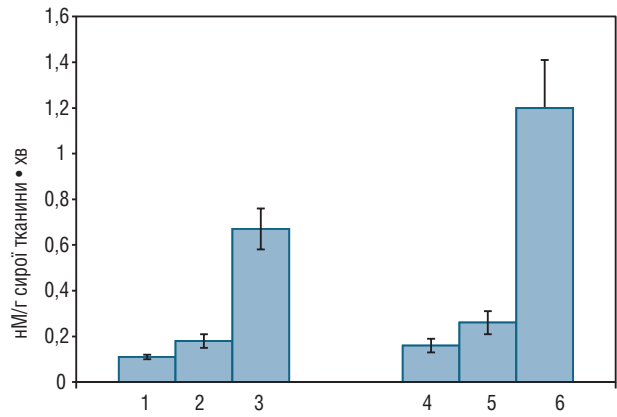


Рис. 1. Швидкість генерування СР мітохондріями НЖТ (1), ЖТВ (2) і ППЖТ (3) до та після (відповідно 4, 5, 6) інкубації з TNF- $\alpha$

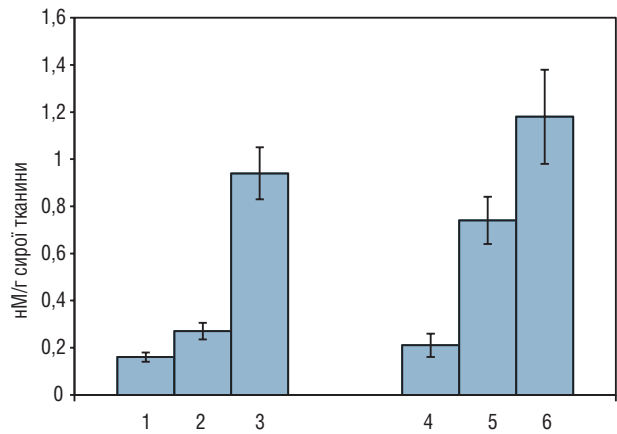


Рис. 2. Рівень 8-охоG в НЖТ (1), ЖТВ (2) і ППЖТ (3) до та після (відповідно 4, 5, 6) інкубації з TNF- $\alpha$

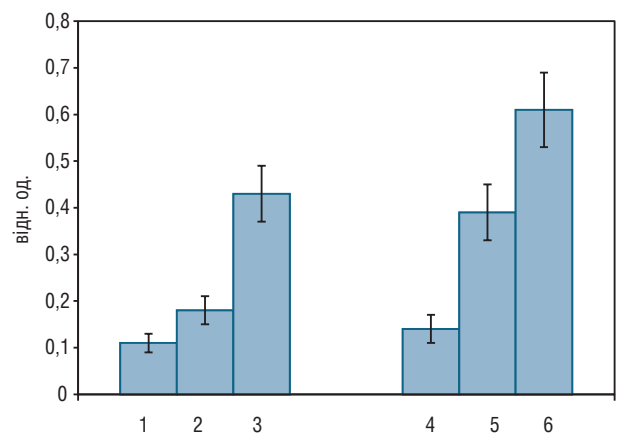
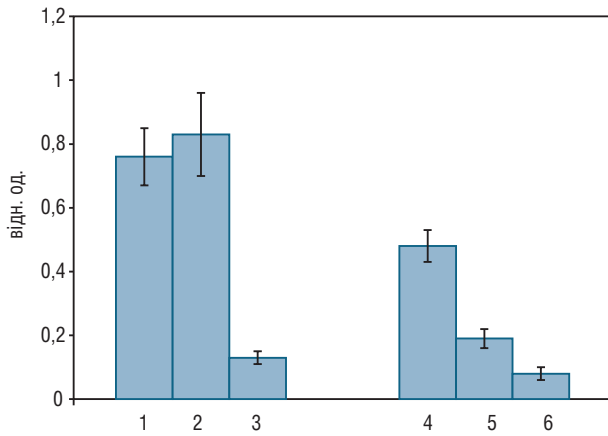
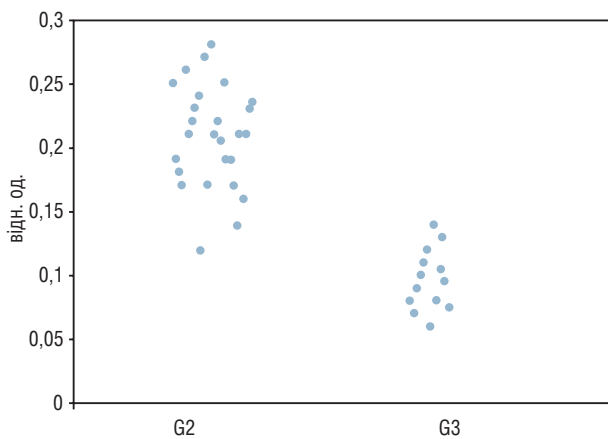


Рис. 3. Рівень комплексів NO-FeS-білки в ЕТЛ мітохондрій у клітинах НЖТ (1), ЖТВ (2) і ППЖТ (3) до та після (відповідно 4, 5, 6) інкубації з TNF- $\alpha$

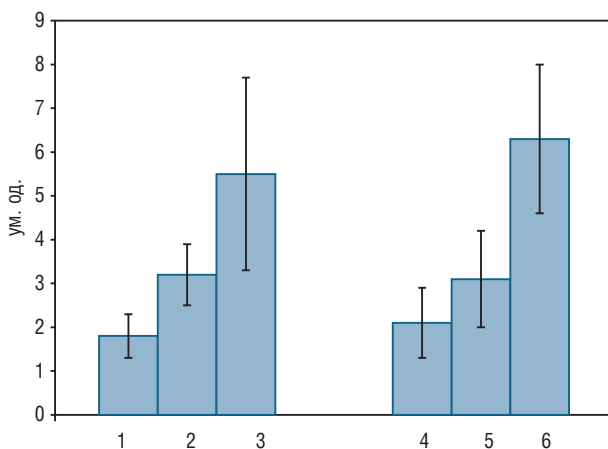
Інкубація досліджуваних зразків *in vitro* з TNF- $\alpha$  індукує достовірно порівняно з вихідними даними зниження рівнів активності Комплексу I ЕТЛ до  $0,19 \pm 0,03$  відн. од. — у ЖТВ (у 4,4 раза;  $p < 0,05$ ) та до  $0,08 \pm 0,02$  відн. од. — у ППЖТ (у 4,2 раза;  $p < 0,05$ ). У НЖТ цей показник знижується недостовірно — лише до  $0,68 \pm 0,05$  відн. од. ( $p > 0,05$ ). Існують



**Рис. 4.** Активність Комплексу I ЕТЛ мітохондрій клітин НЖТ (1), ЖТВ (2) і ППЖТ (3) до та після (відповідно 4, 5, 6) інкубації з TNF- $\alpha$

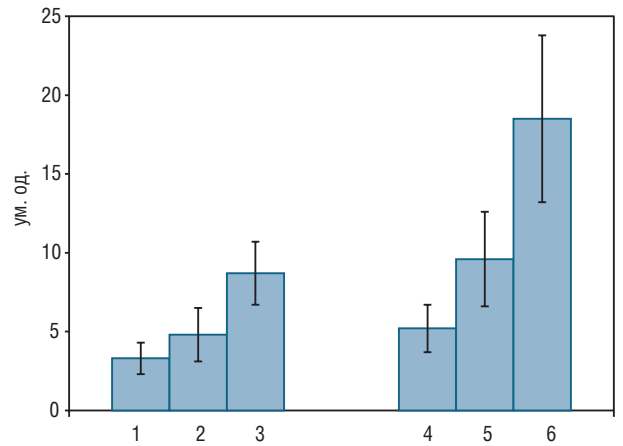


**Рис. 5.** Активність Комплексу I ЕТЛ мітохондрій ППЖТ залежно від ступеня диференціювання РПК



**Рис. 6.** Активність MMP-2 в НЖТ (1), ЖТВ (2) і ППЖТ (3) до та після (відповідно 4, 5, 6) інкубації з TNF- $\alpha$

дані про те, що саме субодиниці Комплексу I ЕТЛ мітохондрій NDUFA4 і NDUFA5 визначають його електронтранспортну функцію і таким чином формують редокс-статус пухлини, який співвідноситься з її метастатичним потенціалом, що може мати прогностичне значення [8]. Тобто, можливо, саме в цих ділянках мітохондріальний Комплекс I ЕТЛ



**Рис. 7.** Активність MMP-9 в НЖТ (1), ЖТВ (2) і ППЖТ (3) до та після (відповідно 4, 5, 6) інкубації з TNF- $\alpha$

клітин ЖТ пошкоджується запальними цитокінами, зокрема низькими концентраціями TNF- $\alpha$  (такими, які не викликають загибелі клітин), результатом чого може стати зниження рівнів активності FeS-білків в іншій субодиниці — NDUFA13.

Зниження активності Комплексу I ЕТЛ мітохондрій ППЖТ залежить від ступеня диференціювання пухлини (рис. 5). Відомо, що субодиниця NDUFA13 першою перепрограмується з окисного метаболізму на гліколіз при пухлинній прогресії [8]. Показано, що ступеню диференціювання РПК G2 відповідає рівень активності FeS-білків  $0,22 \pm 0,035$  відн. од., а G3 —  $0,1 \pm 0,018$  відн. од. ( $p > 0,05$ ). Виявлено, що рівень активності Комплексу I ЕТЛ мітохондрій у ППЖТ корелює зі ступенем диференціювання РПК ( $r = 0,64$ ;  $r = 0,47$ ;  $p < 0,05$ ).

MMP, і серед них MMP-2 та -9 (желатинази), здатні шляхом протеолізу руйнувати позаклітинний матрикс (ПМ), як за нормальних фізіологічних умов, так і при низці патологічних станів, зокрема при інвазивному рості первинних пухлин, метастазуванні, неоангіогенезі [13, 14]. Останніми роками стало відомо, що ожиріння, як і пухлинна прогресія, супроводжується хронічним запаленням, одним із проявів якого є активація MMP у ЖТ [15]. Тому, з огляду на роль ожиріння в перебігу злоякісного новоутворення [16], видалося доцільним вивчення впливу пухлини на рівні деструкції ПМ і механізмів її реалізації в ППЖТ, пов'язаних із запаленням.

Визначено рівні активності желатиназ залежно від наявності пухлини та під дією TNF- $\alpha$ . Показано, що активність MMP-2 у ЖТВ ( $3,2 \pm 0,7$  ум. од.) майже в 2,0, а у ППЖТ ( $5,5 \pm 1,2$  ум. од.) — у 3,0 раза вища, ніж у НЖТ ( $1,8 \pm 0,5$  ум. од.;  $p < 0,05$ ; рис. 6). Для MMP-9 також характерні в 2,6 раза вищі показники активності в ППЖТ порівняно з НЖТ ( $p < 0,05$ ) (рис. 7). Таким чином, пухлина сприяє підвищенню активності желатиназ та, вірогідно, рівня деструкції ПМ у ППЖТ. Перепрограмовані адипоцити ППЖТ, як показано вище, продукують високі рівні СР, які стимулюють запальні процеси і є регуляторами синтезу та активації желатиназ [17]. Крім

того, найважливішим джерелом желатиназ є макрофаги, зокрема в пухлині [18, 19] та ЖТ [13, 14]. З іншого боку, ММП, продукція яких контролюється СР, самі регулюють процеси запалення. Так, відомо, що ММП полегшують рекрутування запальних клітин шляхом розщеплення медіаторів запалення [20].

Показано, що TNF- $\alpha$  достовірно сприяє підвищенню активності ММП-9 у ЖТВ і ППЖТ — у 2,0 раза: з  $4,8 \pm 1,7$  та  $8,7 \pm 2$  до  $9,6 \pm 3$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) та  $18,5 \pm 5,3$  ум. од. ( $p < 0,05$ ) відповідно, але не впливає на ММП-9-активність НЖТ ( $p > 0,05$ ) (див. рис. 7). Натомість, активність ММП-2 у НЖТ і ЖТВ лишилася майже незмінною, а в ППЖТ підвищилася несуттєво порівняно з вихідними значеннями ( $p > 0,05$ ) (див. рис. 6).

Отримані результати пояснюються редоксзалежною активацією ММП-9, на підтвердження чого нами показано кореляцію між рівнями генерування СР адипоцитами та активністю ММП-9 в ЖТ при дії TNF- $\alpha$  ( $r = 0,53$ ;  $p < 0,05$ ). У низці досліджень встановлено, що TNF- $\alpha$  регулює активність проангіогенної ММП-9 через MAPKs-сигнальний шлях [21–24], активацію NF- $\kappa$ B [23], протеолітичне моделювання рецептора циклооксигенази-2 [25] та інші шляхи, медіаторами яких є СР [17]. ММП-2 теж є редоксзалежним ферментом, але відомості щодо її регуляції TNF- $\alpha$  дещо обмежені [26]; при цьому є дані про те, що ММП-2 може, у свою чергу, регулювати TNF- $\alpha$ , коригуючи дисбаланс прозапального фактора відповідно до рівнів деструкції ПМ і стримує розвиток запалення. Показано, зокрема, зниження рівнів експресії TNF- $\alpha$  у ММП-2-нульових мишей [27]. Відсутність змін активності ММП-2 під дією TNF- $\alpha$  може бути наслідком взаєморегуляції ММП-2 та TNF- $\alpha$ , коли при надлишкових концентраціях прозапального фактора включаються відповідні компенсаторні механізми, зокрема через регуляторний вплив ММП-2.

Перепрограмування метаболізму мітохондрій є спільною ознакою всіх видів злоякісних пухлин. Ступінь перепрограмування мітохондрій клітин пухлини є критичним фактом у подальшому посиленні запалення в ЖТВ і ППЖТ хворих онкологічного профілю. Гіпертрофована і дисфункціональна ЖТ при пухлинному процесі характеризується активацією генерування СР, що проявляється запаленням. Ми вважаємо, що мітохондрії НЖТ не реагують на вплив прозапального цитокіну через наявність відповідних компенсаторних механізмів, функція яких у ЖТВ і ППЖТ є вже пошкодженою під впливом пухлини. Виходячи з отриманих нами результатів, можна стверджувати, що мітохондрії в ЖТ відіграють важливу роль в енергетичному обміні та можуть бути пошкоджені пухлиною. Крім того, в клітинах ЖТ хворих зі злоякісними пухлинами шлунково-кишкового тракту, зокрема при РПК, виявлено дисфункцію мітохондріального електрон-транспортного Комплексу I, зміну структури ЕТЛ мітохондрій, що проявляється модифікацією ре-

докс-стану ЖТ, та високі рівні окисно-індукованих мутацій у ДНК. Пошкодження окисного фосфорилювання спричинює відповідні зміни в клітинному редокс-стані та ініціює зростання генерування СР.

Дисфункція мітохондрій адипоцитів може ініціювати дисплазію та бути використаною при діагностуванні та прогнозуванні перебігу захворювання, що корелює з показниками метастазування та агресивним фенотипом РПК.

## ВИСНОВКИ

1. Аденокарциноми прямої кишки змінюють редокс-стан мітохондрій ППЖТ і викликають зниження активності Комплексу I ЕТЛ мітохондрій, що проявляються підвищеними рівнями СР, окисно-індукованих пошкоджень ДНК адипоцитів та активацією желатиназ, які здатні руйнувати міжклітинний матрикс.

2. Виявлено, що інкубація НЖТ, ЖТВ і ППЖТ із запальним цитокіном TNF- $\alpha$  викликає зміни редокс-стану мітохондрій та активацію низки факторів запалення (СР, NO $^{\cdot}$ , ММП) лише в тканинах, в яких вже відбулося перепрограмування метаболізму під впливом пухлини — у ЖТВ і ППЖТ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Schwartz B, Yehuda-Shnaidman E. Putative role of adipose tissue in growth and metabolism of colon cancer cells. *Front Oncol* 2014; **4**: 164.
2. Marsiglia L, Manti S, D'Angelo G, et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci* 2015; **16** (1): 378–400.
3. Liu GS, Chan EC, Higuchi M, et al. Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response. *Cells* 2012; **1** (4): 976–93.
4. Ramos-Nino ME. The role of chronic inflammation in obesity-associated cancers. *ISRN Oncol* 2013; **2013**: 697521.
5. Burlaka AP, Sidorik EP, Ganusevich II, et al. Effects of radical oxygen species and NO: formation of intracellular hypoxia and activation of matrix metalloproteinases in tumor tissues. *Exp Oncol* 2006; **28** (1): 49–53.
6. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* 2014; **2**: 17.
7. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К: Наукова думка, 2006. 227 с.
8. Shabalina IG, Vrbacký M, Pecinová A, et al. ROS production in brown adipose tissue mitochondria: the question of UCP1-dependence. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1837** (12): 2017–30.
9. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett* 2008; **582** (1): 117–31.
10. Burlaka AP, Sidorik EP, Ganusevich II, et al. High formation of superoxide anion and nitric oxide, and matrix metalloproteinases activity in vascular wall of rectal carcinoma vessels. *Exp Oncol* 2006; **28**: 323–5.
11. Burlaka AP, Ganusevich II, Lukin SN, et al. Superoxide and NO-dependent mechanisms of the reprogramming of bone marrow cells by tumor cells. *Appl Magn Reson* 2014; **45**: 1261–73.
12. Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, et al. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab* 2011; **14**: 537–44.
13. Kassenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; **141**: 52–67.

14. Noel A, Gutierrez-Fernandez A, Sounni NE, *et al.* New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol* 2012; 3: 1–9.
15. Al-Zhoughbi W, Huang J, Paramasivan GS, *et al.* Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol* 2014; 41: 281–95.
16. Nieman Km, Romero Il, Van Houten B, *et al.* Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 1533–41.
17. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; 44 (5): e10.3109.
18. Van Kempen LC, Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 728–34.
19. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66: 605–11.
20. Marconi C, Bianchini F, Mannini A, *et al.* Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 225–31.
21. Kim KC, Lee CH. MAP kinase activation is required for the MMP-9 induction by TNF-stimulation. *Arch Pharm Res* 2005; 28 (11): 1257–62.
22. Lee IT, Lin CC, Wu YC, *et al.* TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: role of TNFR1/ TRAF2/PKCalpha-dependent signaling pathways. *J Cell Physiol* 2010; 224 (2): 454–64.
23. Tsai C-L, Chen W-C, Hsieh H-L, *et al.* TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2-mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Biomed Sci* 2014; 21: 12.
24. Lee SJ, Park SS, Cho YH, *et al.* Activation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human urinary bladder cancer HT1376 cells: the role of MAP kinase signaling pathways. *Oncol Rep* 2008; 19 (4): 1007–13.
25. Steenport M, Khan KMF, Du B, *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2009; 183: 8119–27.
26. Kesanakurti D, Chetty C, Bhoopathi P, *et al.* Suppression of MMP-2 attenuates TNF-alpha induced NF- $\kappa$ B activation and leads to JNK mediated cell death in glioma. *PLoS One* 2011; 6 (5): e19341.
27. De Groef L, Salinas-Navarro M, Van Imschoot G, *et al.* Decreased TNF levels and improved retinal ganglion cell survival in MMP-2 null mice suggest a role for MMP-2 as TNF sheddase. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 108617.

## REDOX-DEPENDENT MECHANISMS OF INFLAMMATION IN ADIPOSE TISSUE OF PATIENTS WITH RECTAL CANCER

A.P. Burlaka, I.I. Ganusevich, A.V. Vovk, V.V. Golotiuk, S.M. Lukin

**Summary.** *The study of tumor involvement in metabolism changes adjacent to the tumor fatty tissue (ATFT) are important for understanding the complex relationships between the tumor and fatty tissue (FT) that contribute to the progression of the disease. The source of the damaging effects on FT can be mitochondrial superoxide radicals (SR) and NO<sup>•</sup> of tumors, which may contribute to the progression of the latter due to the activation of its redox-dependent pathways. Given the fact that FT*

*is an important energy source for tumor cells, understanding the mechanism of metabolic symbiosis in tumor cells from FT can be the basis to create new therapeutic approaches. Objective: to carry out the redox-dependent mechanisms in normal fatty tissue (NFT) obtained from patients without oncological disease, ATFT at a distance of 3 cm from the ATFT, the activity of metalloproteinases (MMP-2, -9) in these tissues and the effect of TNF- $\alpha$  in it. Object and Methods: the study was conducted on 46 samples of ATFT patients with rectal cancer (RC) II–III stages (pT2–3pN0–2pM0) and 26 samples FT. As control was used the FT of 11 healthy men, taken after performing liposuction in a specialized medical center, in observance of sterility. Among the examined patients the number of women and men was 21 and 25, respectively, and the average age was of 64.0  $\pm$  1.6 years. The used methods were electron paramagnetic resonance at the temperature of liquid nitrogen and the technology Spin Traps, sonograph in polyacrylamide gels, biochemical, and statistical methods. Results: influencing electron transport chain (ETC) of mitochondria ATFT, particularly for Complex I, the tumor causes an increase in the speed of generating the SR and, accordingly, oxidative modifications of DNA in ATFT. The level of generation of SR, and the oxidation-induced DNA mutations in the mitochondria of the latter, were respectively at 6.1 and 5.8 times higher in comparison with NFT ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ) and 3.7 and 3.5 times higher than those in distant FT ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). Gelatinase activity of MMP-2, -9 ATFT was significantly higher than in distant FT. There was a significant effect of in vitro TNF- $\alpha$  on mitochondria ATFT and distant FT (but not NFT), which is manifested by increase in cellular hypoxia, speed of generating the SR, gelatinase activity. Conclusions: under the influence of factors of a malignant tumor the protumor phenotype is formed of ATFT, which is characterized by high levels of SR, oxidative modifications of DNA and activity of MMP. Incubation of NFT, distant FT and ATFT with proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  causes changes in the redox state of the mitochondria and activation of several inflammatory factors (SR, NO<sup>•</sup>, MMP) in the tissues, where there was already reprogramming of metabolism under the influence of the tumor — in ATFT and, to a lesser extent, distant FT.*

**Key Words:** superoxide radicals, mitochondria, nitric oxide, adipose tissue, rectum cancer.

**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: ap\_burlaka@email.ua

Одержано: 22.06.2016