

А.П. Булка
І.І. Ганусевич
С.М. Лукін
Є.П. Сидорик

РЕДОКСЗАЛЕЖНІ МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ПУХЛИНИ З КІСТКОВИМ МОЗКОМ

Інститут експериментальної
патології, онкології
та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН
України, Київ, Україна

Ключові слова: пухлина,
кістковий мозок, супероксидні
радикали, комплекси
«вільного заліза», матриксні
металопротеїнази.

Активация систем генерування супероксидних радикалів комплексами «вільного заліза» в кістковому мозку (КМ) є одним з механізмів, який шляхом активації матриксних металопротеїназ (ММП) забезпечує розповсюдження пухлинних клітин (ПК) в організмі — інвазію і метастазування. **Мета:** порівняльне вивчення показників вмісту комплексів «вільного заліза» в КМ пацієнтів без онкологічної патології та хворих на рак молочної залози (РМЗ) з метастазами і без них, а також експериментальна перевірка на моделях *in vitro* та *in vivo* взаємозв'язку між рівнем комплексів «вільного заліза», генеруванням супероксидних радикалів і NO та активністю ММП (зокрема ММП-2 та -9). **Об'єкт і методи:** досліджено зразки КМ 18 хворих на РМЗ (T2-4N1-2M0-1) (основна група) та 5 пацієнтів з політравою (контрольна група). Дослідження *in vivo* проведено на безпородних щурах-самцях з перещепленою карциномою Герена (20 тварин, основна група) та інтактних (10 тварин, контрольна група). Взаємодію ПК і клітин КМ інтактних щурів і тварин з карциномою Герена вивчали в системі *in vitro*, кокультивуючи клітини протягом 24 год. Використано метод електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР), спінові уловлювачі, зимографію. **Результати:** виявлено аналогічні відмінності спектрів ЕПР КМ пацієнтів основної та контрольної груп, а також тварин з карциномою Герена та інтактних, які вказують на накопичення в КМ як хворих на РМЗ (особливо з М1), так і щурів з пухлиною комплексів «вільного заліза» з прооксидантними властивостями. У пухлинній тканині (карцинома Герена) виявлено підвищені порівняно з КМ вихідні показники рівня залізо-вмісних комплексів, генерування супероксидних радикалів, активності желатиназ ММП-2, -9. Після кокультивування ПК і клітин КМ *in vitro* наведені показники в клітинах КМ (як інтактних щурів, так і тварин з пухлиною) зростали як на межі контакту з ПК, так і на відстані від нього. **Висновки:** вплив пухлини на КМ (як *in vivo*, так *in vitro*, можна охарактеризувати як накопичення в останньому її метаболітів («вільного заліза»), які можуть ініціювати нерегульоване генерування супероксидних радикалів і активацію ММП, що створює сприятливі умови для дисемінованих ПК. Тому визначення рівнів генерування супероксидних радикалів та активності ММП в нормальних тканинах хворих на рак може бути корисним при розробці методів оцінки ризику раннього метастазування.

ВСТУП

Відомо, що при багатьох типах злоякісних солідних пухлин розповсюдження пухлинних клітин (ПК) в організмі через лімфатичні і кровоносні судини починається на достатньо ранніх стадіях процесу, значно випереджаючи в часі появу клінічних проявів метастазів. Встановлено клінічну значущість наявності ПК в периферичній крові та кістковому мозку (КМ) [1–3]. Зокрема, у хворих на рак молочної залози (РМЗ) циркуляція ПК в крові та їх дисемінація зумовлює розвиток після проведеного лікування так званої мінімальної залишкової хвороби з подальшим прогресуванням пухлинного процесу [4–6]. Поступово накопичуються результати досліджень, які вказують, що злоякісна пухлина здатна створювати сприятливі умови (так звані метастатичні ніші) для осідан-

ня циркулюючих ПК, збереження їх життєздатності, виходу з «дрімотного стану» та формування в подальшому метастазів у віддалених органах і тканинах. Такий вплив реалізується шляхом формування в останніх сприятливого для ПК клітинного та метаболічного мікрооточення [7, 8]. Механізми цього феномену вивчено недостатньо. Серед молекулярних шляхів відповідних змін у передметастатичних сайтах значну увагу привертає активація матриксних металопротеїназ (ММП), які шляхом протеолізу забезпечують міграцію та дисемінацію ПК і є критичними молекулами супроводу інвазії та метастазування, а також залежність активності ММП від метаболізму ПК і нормальних клітин мікрооточення [8–10].

Як в нормальній, так і в пухлинній тканинах важливою групою сигнальних молекул є супероксидні радикали, але їх генерування в пухлинах значно під-

вищене. ПК, набувши метаболічних змін, змінюють і своє мікрооточення. Для них є властивим «перепрограмування» мітохондрій, яке характеризується підвищеною активністю аеробного гліколізу і ліпідного метаболізму, що дозволяє ПК адаптуватися до середовища з високим рівнем супероксидних радикалів, підвищує їх здатність до виживання в прооксидантному мікрооточенні. Вплив ПК на клітини, які їх оточують, зокрема на клітини КМ, в основному спрямований на порушення обміну речовин у мітохондріях, підвищення синтезу супероксидних радикалів у клітинах стромы [11–14]. Відомо, що основною функцією мітохондрій клітин є синтез аденозинтрифосфату (АТФ) при окисному фосфорилуванні. У процесі гліколізу також синтезується АТФ, забезпечуючи компенсаторний механізм в умовах, коли окисне фосфорилування стає неефективним внаслідок дефектів у дихальному ланцюгу мітохондрій. Електрони, транспортуючись по дихальному ланцюгу, можуть «витікати» з електронних комплексів і відновлювати молекулярний кисень до супероксидних радикалів. При цьому мітохондрії стають основним продуцентом останніх [15].

Чинником впливу ПК на метаболізм мітохондрій нормальних клітин мікрооточення, на наш погляд, можуть служити, крім інших, комплекси «вільного заліза». Іони заліза мають вирішальне значення для багатьох фундаментальних клітинних процесів, включаючи синтез ДНК, регуляцію клітинного циклу, проліферацію клітин. Білки, які містять залізо-сірчані кластери, підтримують стабільність геному, забезпечують енергією життєдіяльність клітин. Водночас залізо — потенційно токсичний елемент: його надлишок може ініціювати канцерогенез, викликаючи нерегульоване зростання окисно-індукованих пошкоджень. Високі рівні дієтичного споживання заліза асоціюються з підвищенням ризику розвитку деяких видів раку, особливо колоректального. Відомо також, що при спадковому гемохроматозі реєструється накопичення надлишкових рівнів заліза, що пов'язують з підвищенням ризику розвитку раку у таких людей [16]. ПК змінюють метаболізм заліза, сприяючи його накопиченню в мікрооточенні, шляхом підвищення рівня білків, залучених у процес поглинання заліза і його транспорт (феритин, трансферин, STEAP білків і ліпокалін 2 — LCN2), а також шляхом зменшення відтоку заліза через ферропортин. Інші білки — регулятори вмісту заліза в клітинах, такі як IRP1 і IRP2, також сприяють ініціації канцерогенезу, але є менш вивченими. У результаті пухлина створює надлишкові рівні іонів заліза, які здатні перепрограмувати метаболізм мітохондрій і активність НАДФ•Н-оксидаз нормальних клітин у напрямку посиленого генерування супероксидних радикалів, що сприяє формуванню окисного фенотипу, необхідного для прогресування пухлинного осередку [16, 17].

Враховуючи вищевикладене, метою нашого дослідження було порівняльне вивчення показників вмісту комплексів «вільного заліза» у КМ пацієнтів без

онкологічної патології та хворих на РМЗ з метастазами і без них, а також експериментальна перевірка на моделях *in vitro* і *in vivo* взаємозв'язку між рівнем комплексів «вільного заліза», генеруванням супероксидних радикалів і NO та активністю ММП (зокрема ММП-2 та -9).

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено зразки КМ 18 хворих на РМЗ (Т2–4N1–2M0–1), які перебували на лікуванні в Київському міському клінічному онкологічному центрі (основна група), та 5 пацієнтів з політравмою, які одержували лікування в Київській міській клінічній лікарні швидкої допомоги (контрольна група). Усі пацієнти були поінформовані та дали згоду на використання зразків їх КМ в дослідницьких цілях. Середній вік пацієнтів основної групи становив $50,6 \pm 7,4$, контрольної — $46,2 \pm 9,8$ року. В основній групі пацієнок розподіляли за стадіями захворювання наступним чином: стадія II — 8, стадія III — 4, стадія IV — 6 осіб. Таким чином, у дослідження було залучено 12 хворих без віддалених метастазів РМЗ і 6 — з віддаленими. У всіх пацієнок діагноз РМЗ, стадію захворювання та наявність віддалених метастазів верифіковано відповідно до вимог доказової медицини (у ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно).

Як в основній, так і в контрольній групах, зразки КМ вилучали до початку лікування шляхом пункції гребінця здухвинної кістки. Аспірацію проводили через голку Касирського шприцем об'ємом 20 мл, який містив 1,5 мл 6% розчину цитрату натрію. Отриманий матеріал заморожували в спеціальних прес-формах у рідкому азоті ($T = 77$ К), після чого проводили його аналіз на комп'ютеризованому радіоспектрометрі PE-1307 в парамагнітно чистому кварцовому дьюарі за температури 77 К.

Експериментальні дослідження проведено на 30 безпородних щурах-самцях розплоду віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України з масою тіла $100,0 \pm 9,0$ г з дотриманням правил Комісії з етичних норм роботи з експериментальними тваринами. 20 тварин з перещепленою відповідно до методики [18] карциномою Герена становили основну групу, 10 інтактних тварин — контрольну. Зразки КМ отримували зі стегнових і великих гомілкових кісток шляхом стерильної промивки діафізів фосфатним буферним розчином ($pH = 7,4$) і дезагрегації отриманої суспензії клітин КМ [19]. Кількість клітин КМ на кістку (середній показник інтактних щурів $60,70 \pm 4,48 \times 10^6$ /кістку) визначали шляхом обчислення в камері Горяєва.

Швидкість генерування супероксидних радикалів клітинами пухлини (карцинома Герена) і КМ (пацієнтів і лабораторних тварин) досліджували методом електронно-парамагнітного резонансу (ЕПР) з використанням технології Spin Traps (спіновий уловлювач — 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-охо-

pipеридин гидрохлорид (TEMPONE-H)) за умов температури рідкого азоту на комп'ютеризованому радіоспектрометрі PE-1307 [20].

У зразках пухлинної тканини та КМ визначали концентрацію активних та латентних форм ММП-2 та -9 методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину в якості субстрату) на основі SDS-електрофорезу білків [21]. Після відмивання гелю активні форми ММП-2 та -9 візуалізувалися у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, локалізація яких визначалася за стандартами молекулярної маси («Sigma») і відповідала молекулярній масі кожного із ферментів (72 та 92 кДа відповідно). Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом вимірювання площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і -9 («Sigma»). Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

Взаємодію ПК і КМ інтактних щурів і тварин з карциномою Герена вивчали в системі *in vitro*. Чашку Петрі розділяли по лінії діаметра скляною пластинкою на дві частини, дно кожної з яких покривали тонким шаром (3 мм) рідкого колагену («Sigma»). У ліву частину чашки вносили суспензію клітин КМ, в праву — суспензію клітин карциноми Герена. Об'єм кожної з суспензій — 1,0 мл, концентрація — $0,2-0,3 \times 10^6$ клітин/мл, живильне середовище — 199 з 10% сироватки ембріонів/новонароджених телят («РАА», Австрія). Чашки інкубували у зволоженій атмосфері при 37°C у присутності 5% CO_2 протягом 12 год, після чого розподільну пластину виймали. Внаслідок фіксування клітин до монопару колагену спостерігали візуальну чітку межу контакту суспензій ПК і клітин КМ. Продовжували інкубацію за описаних вище умов ще впродовж 12 год. Генерування супероксидних радикалів та активність ММП-2 і -9 визначали в ПК і клітинах КМ до (вихідний рівень) та після інкубації *in vitro*. Кінцева життєздатність клітин, визначена за тестом із трипановим синім, становила 80–90%. Контрольними вважали чашки Петрі, в яких ПК та клітини КМ інкубували впродовж 24 год, не видаляючи розподільну пластину.

Результати дослідів обчислені з використанням параметричних статистичних критеріїв, представлені як Mean \pm SD, статистично достовірними вважали рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пунктат КМ містить кровотворні й некровотворні клітинні елементи, клітини ретикулярної стромы і паренхіми. Ретикулярна строма КМ включає фібробласти, остеобласти, ендотеліальні клітини, клітини жирової тканини, а також нейтрофіли і макрофаги. Усі ростки кровотворення починаються з бластних елементів, продовжуються проміжними формами дозрівання і закінчуються зрілими клітинами. Основними ЕПР-сигнал-формувальними і супероксид-генеруючими клітинами КМ є фібро-

бласти, остеобласти, ендотеліальні клітини, клітини жирової тканини, нейтрофіли, макрофаги.

Спектри ЕПР КМ пацієнтів з політравмою (рис. 1) та інтактних тварин (рис. 2) містять наступні сигнали: із $g = 2,00$, який характеризує рівень флавоубісеміхінонів в електронтранспортному ланцюгу мітохондрій; із $g = 2,03$, інтенсивність якого свідчить про рівень утворення комплексів NO з FeS-білками в електронтранспортному ланцюгу мітохондрій; із $g = 1,94$, який демонструє стан FeS-білка N-2 в НАД \cdot H-оксидоредуктазному електронтранспортному комплексі дихального ланцюга мітохондрій (швидкість генерування супероксидних радикалів в інтактному КМ визначається в межах $0,28 \pm 0,11$ нмоль/ 10^3 клітин \cdot хв).

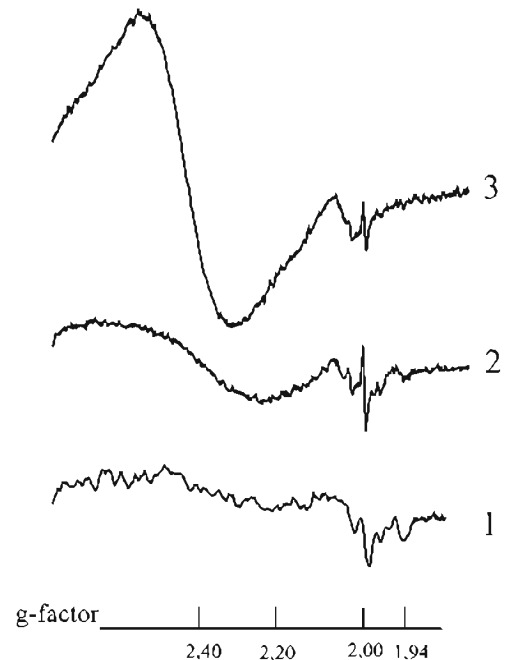


Рис. 1. Спектри ЕПР при $T = 77\text{ K}$: 1 — КМ при політравмі; 2 — КМ при РМЗ без метастазів; 3 — КМ при РМЗ з віддаленими метастазами

Спектри ЕПР КМ хворих на РМЗ без метастазів (T2–3N1–2M0) мають ряд відмінностей порівняно зі спектром ЕПР КМ людей без онкологічної патології (див. рис. 1). Зростає рівень флавоубісеміхінонів (сигнал із $g = 2,00$), що свідчить про підвищення активності Q-циклу Мітчелла в третьому електронтранспортному комплексі дихального ланцюга мітохондрій. Зростає інтенсивність сигналу ЕПР із $g = 2,03$, що свідчить про взаємодію NO, синтезованого mNOS, з FeS-білками мітохондрій з порушенням процесу окисного фосфорилування. Також з'являється слабкий сигнал ЕПР із $g = 2,2-2,4$, який вказує на наявність у КМ комплексів «вільного заліза» з прооксидантними властивостями (швидкість генерування супероксидних радикалів у зразках КМ цієї підгрупи хворих становить $0,75 \pm 0,15$ нмоль/ 10^3 клітин \cdot хв). Слід підкреслити, що такий сигнал у тканинах тварин і людини в нормі не визначається. Таким чином, у підсумку, в КМ пацієнтів з РМЗ без віддалених метастазів створюються умови для виживання ПК.

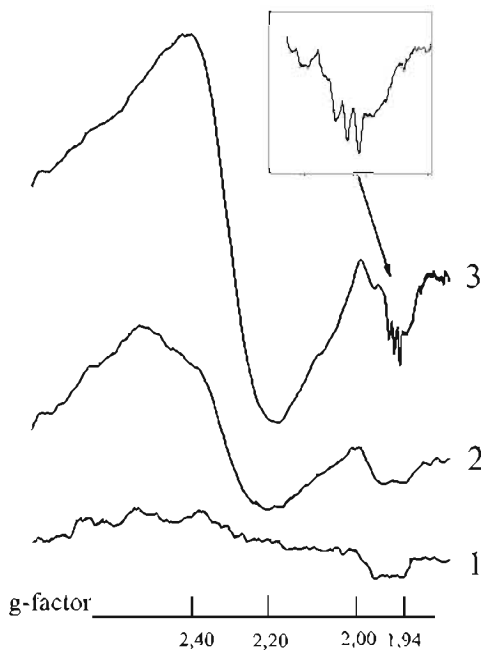


Рис. 2. Спектри ЕПР при $T = 77\text{ K}$: 1 — КМ інтактних тварин; 2 — КМ тварин з карциномою Герена; 3 — карцинома Герена. Триплетний сигнал ЕПР, властивий для злоякісних пухлин (виділено окремо)

Структура спектрів ЕПР КМ хворих з віддаленими метастазами РМЗ (Т2–4N1–2M1) змінена ще більшою мірою (див. рис. 1): знижується інтенсивність сигналу ЕПР з $g = 1,94$; в 2 рази зростає рівень комплексів NO з FeS-білками ($g = 2,03$) з поступовим формуванням сигналу ЕПР з триплетною структурою та $g = 2,007$; в 4 рази підвищується рівень комплексів «вільного заліза» ($g = 2,2–2,4$), за цих умов швидкість генерування супероксидних радикалів зросла до $2,95 \pm 0,16$ нмоль/ 10^3 клітин \cdot хв і більше.

На рис. 2 представлено спектри ЕПР КМ інтактних тварин (1), КМ тварин з перещепленою карциномою Герена (2) і тканини карциноми Герена (3). Як зазначено вище, в спектрі ЕПР КМ інтактних тварин визначаються сигнали ЕПР з $g = 2,00$, $g = 1,94$, $g = 2,03$. Ознака, яка відрізняє від спектра (1) спектри ЕПР (2) і (3), — це наявність у них інтенсивного сигналу в ділянці g -фактора спектроскопічного розщеплення 2,2–2,4 (накопичення комплексів «вільного заліза»). Поява комплексів «вільного заліза» може бути пов'язана з окисно-індукованим порушенням мембран, гемолізом, деструкцією залізовмісних білків та ін. На ранніх стадіях розвитку злоякісних пухлин концентрація комплексів «вільного заліза» в крові і тканині пухлини зростає внаслідок декомпартменталізації іонів заліза.

На рис. 3, 4 зображено спектри ЕПР клітин КМ інтактних тварин (1) та тварин з карциномою Герена (2) після коінкубації з ПК (карцинома Герена) *in vitro*. У клітинах КМ інтактних тварин (див. рис. 3, спектр 1), які були відібрані для аналізу в зоні прямої взаємодії з ПК, рівень сигналу ЕПР комплексів «вільного заліза» реєструвався в межах $1,30 \pm 0,11$ відн. од., у той час як в клітинах КМ тва-

рин з пухлиною (див. рис. 3, спектр 2) за тих самих умов — $5,20 \pm 0,25$ відн. од. ($p < 0,05$). Таким чином, аналіз спектрів ЕПР на рис. 3 демонструє, що ПК здійснюють свій вплив на клітини КМ щурів з пухлиною посиленням окисних процесів за рахунок накопичених метаболітів, зокрема комплексів «вільного заліза», збільшуючи вміст останніх у міжклітинному матриксі, формуючи окисний фенотип. Інакше кажучи, КМ тварин з пухлиною, порівняно з КМ інтактних тварин, може більш активно накопичувати комплекси «вільного заліза». На відміну від результатів, наведених на рис. 3, клітини КМ інтактних тварин, які були відібрані для аналізу на відстані 1,0 см від межі контакту з ПК (див. рис. 4, спектр 1), накопичували рівні комплексів «вільного заліза», які в 5 разів перевищують такі, виявлені за тих самих умов у клітинах КМ тварин з пухлиною (див. рис. 4, спектр 2). Можливо, комплекси заліза дифундують до клітин КМ тварин з пухлиною повільніше, ніж до клітин КМ інтактних тварин. Важливо підкреслити, що в контрольних пробах (за умов відсутності контакту між ПК і клітинами КМ) в жодному випадку не відзначали достовірної зміни рівня комплексів «вільного заліза» ($p > 0,05$).

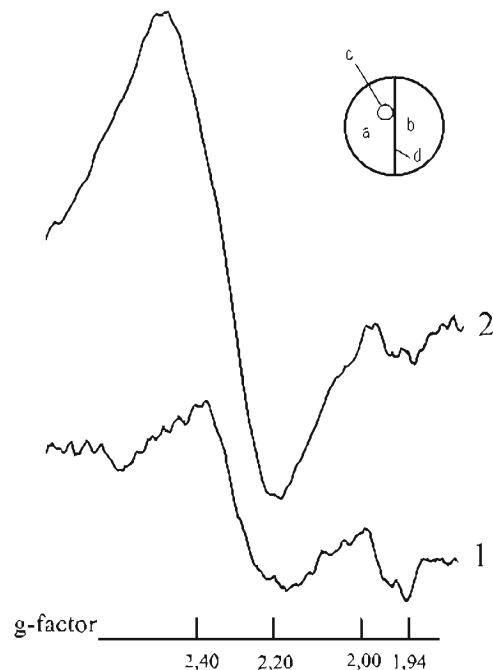


Рис. 3. Спектри ЕПР за $T = 77\text{ K}$: клітини КМ інтактних тварин, відібрані на межі (d) контакту з ПК. 2-клітини КМ тварин з карциномою Герена, відібрані на межі (d) контакту з ПК. Зверху праворуч — схема експерименту: а — клітини КМ; б — ПК; с — місце відбору проби для аналізу; d — межа контакту між ПК клітинами КМ

Результати досліджень швидкості генерування супероксидних радикалів клітинами КМ інтактних тварин, тварин з карциномою Герена та ПК (карцинома Герена) представлено в таблиці. У клітинах КМ інтактних тварин реєструють швидкість генерування супероксидних радикалів на рівні $0,45 \pm 0,03$ нмоль/ 10^3 клітин \cdot хв; у КМ тварин з пух-

линою — $3,52 \pm 0,35$ нмоль/ 10^3 клітин · хв ($p < 0,05$); в карциномі Герена — $2,55 \pm 0,41$ нмоль/ 10^3 клітин · хв.

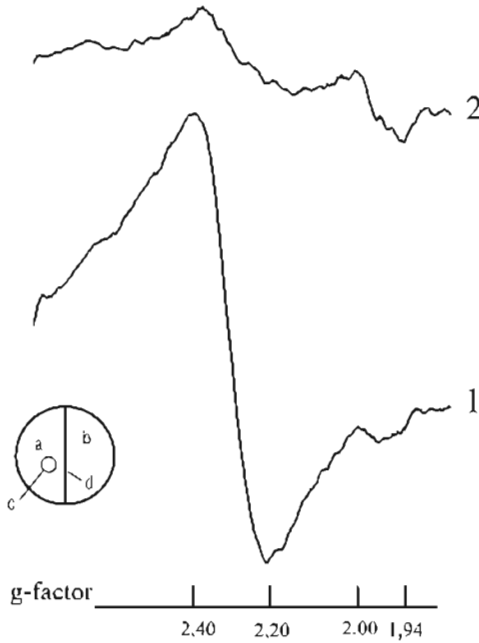


Рис. 4. Спектри ЕПР при $T = 77$ К: 1 — клітини КМ інтактних тварин, відібрані на відстані 1,0 см від межі (d) контакту з ПК; 2 — клітини КМ тварин з карциномою Герена, відібрані для аналізу на відстані 1,0 см від межі (d) контакту з ПК. Внизу ліворуч — схема експерименту: а — клітини КМ; b — ПК; c — місце відбору проби для аналізу; d — межа контакту між ПК клітинами КМ

Після коінкубації з клітинами карциноми Герена швидкість генерування супероксидних радикалів клітинами КМ інтактних щурів, відібраними на межі контакту, зростає практично в 10 разів — до $4,58 \pm 0,23$ нмоль/ 10^3 клітин · хв, а відповідний показник у тварин з пухлиною (за тих самих умов) навіть нижчий за вихідний рівень — $2,26 \pm 0,14$ нмоль/ 10^3 клітин · хв. Тобто, реакція клітин КМ інтактних тварин на вплив ПК *in vitro* проявляється різким посиленням продукування супероксидних радикалів; відповідь клітин КМ тварин з пухлиною практично відсутня.

Клітини КМ інтактних тварин, відібрані для аналізу на відстані 1,0 см від межі контакту з ПК, генерують супероксидні радикали зі швидкістю

$3,06 \pm 0,25$ нмоль/ 10^3 клітин · хв, що в 7 разів ($p < 0,05$) перевищує вихідні значення. За таких самих умов клітини КМ тварин з пухлиною продукують радикали кисню зі швидкістю $2,75 \pm 0,16$ нмоль/ 10^3 клітин · хв. Таким чином, ПК ефективно «перепрограмовують» метаболізм клітин КМ інтактних тварин як при прямій взаємодії, так і на відстані. Відсутність реакції клітин КМ тварин з карциномою Герена, вірогідно, пов'язана з тим, що раніше в організмі тварин з пухлиною КМ вже піддавався такому впливу пухлинного процесу.

Досліджено також рівні активності ММП-2 та -9, продукуюваної карциномою Герена, КМ інтактних тварин та тварин з карциномою Герена до та після контактної інкубації (див. таблицю). Активність обох желатиназ, хоч і на незначному рівні, але визначалася в усіх зразках КМ інтактних тварин і становила $0,18 \pm 0,02$ та $0,36 \pm 0,10$ мкг/г тканини для ММП-2 та -9 відповідно. У КМ тварин з карциномою Герена вихідні рівні активності ММП-9 перевищували такі в КМ інтактних тварин у 5 разів ($p < 0,05$), а ММП-2 — навіть у 50 разів ($p < 0,001$), що свідчить про те, що під впливом первинної пухлини у віддалених органах може формуватися відповідне метаболічне мікрооточення, умови якого сприятливі для майбутнього метастазування [22, 23]. Вихідні значення активності ММП-9 в пухлинній тканині ($5,40$ мкг/г тканини) значно перевищували такі в КМ як інтактних щурів (у 15 разів), так і тварин з карциномою Герена (у 3 рази). Найвищий вихідний рівень активності ММП-2 відзначали в КМ тварин з карциномою Герена; вихідні значення активності ММП-2 в пухлинні були в 20 разів вищими за показники в інтактному КМ, але у 2,5 раза нижчими, ніж показники в КМ тварин з пухлиною, що співвідноситься з даними літератури про відсутність корелятивних зв'язків між експресією желатиназ у пухлинні та метастатичних вузлах [9, 24, 25]. Ймовірно, підвищення протейолітичної активності в процесі формування мікрооточення у віддалених тканинах супроводжується її зниженням у первинній пухлині, причому така динаміка, можливо, характерна саме для ММП-2. Так, в клінічних дослідженнях показано, що концентрація активної форми ММП-2 в тканині раку плунаку перебуває у зворотній залежності від категорії М, тобто

Генерування супероксидних радикалів та активність ММП-2 і -9 у клітинах КМ і ПК (карцинома Герена) до та після контактної інкубації

Таблиця

Показник	Вихідний рівень			Рівень після коінкубації <i>in vitro</i>					
	КМ інтактних тварин	КМ тварин із карциномою Герена	Карцинома Герена	КМ інтактних тварин (межа контакту)	КМ інтактних тварин (1 см від межі контакту)	КМ тварин із карциномою Герена (межа контакту)	КМ тварин із карциномою Герена (1 см від межі контакту)	Клітини карциноми Герена, від контактували з КМ інтактних тварин	Клітини карциноми Герена, від контактували з КМ тварин із карциномою Герена
O_2^- , нмоль/ 10^3 клітин · хв	$0,45 \pm 0,03$	$3,52 \pm 0,35$	$2,55 \pm 0,41^{**}$	$4,58 \pm 0,23^*$	$3,06 \pm 0,25^*$	$2,26 \pm 0,14$	$2,75 \pm 0,16$	$2,80 \pm 0,29$	$2,50 \pm 0,17$
ММП-2, мкг/г тканини	$0,18 \pm 0,02$	$9,00 \pm 2,30$	$3,60 \pm 1,10^{**}$	$2,50 \pm 0,70^*$	$2,50 \pm 0,66^*$	$10,20 \pm 3,10$	$9,90 \pm 3,00$	$1,80 \pm 0,50^*$	$0,90 \pm 0,10^*$
ММП-9, мкг/г тканини	$0,36 \pm 0,10$	$1,80 \pm 0,30$	$5,40 \pm 1,20^{**}$	$1,80 \pm 0,40^*$	$1,80 \pm 0,50^*$	$3,60 \pm 0,70^*$	$0,72 \pm 0,21^*$	$0,93 \pm 0,31^*$	$3,60 \pm 1,30$

* $p < 0,05$ — порівняно з вихідним рівнем; ** $p < 0,05$ — порівняно з рівнем у КМ.

у хворих з метастазами концентрація активних форм ММП-2 в пухлині майже в 2 рази нижча за таку у хворих без метастазів [10]. Максимальна активація латентних форм ММП-2 в пухлинах при M0 може свідчити про значне посилення деструкції позаклітинного матриксу на такому етапі розвитку пухлини, коли віддалені метастази не мають клінічних проявів, тобто, можливо, відбувається їх формування та/або дисемінація ПК. Навпаки, коли відповідне мікрооточення у віддалених місцях та метастатичні вузли сформовані, рівень ММП-2-активності в пухлині значно знижується. Отримані нами результати співвідносяться з наведеними та іншими даними про здатність пухлини через відповідні сигнальні шляхи заздалегідь створювати сприятливе мікрооточення у передметастатичних нішах [7, 26]. Зокрема, в модельних дослідках продемонстровано, що ММП-9 індукувалася у віддалених від пухлини тканинах, випереджаючи метастазування, та була локалізована не лише в ендотеліальних клітинах легень, а й макрофагах [26].

Після контактної інкубації з ПК показники активності ММП-2 в клітинах КМ інтактних тварин зросли майже в 14 разів як на межі контакту, так і на відстані 1 см від нього. Одночасно концентрація активної ММП-2 в ПК знижувалася порівняно з вихідними значеннями в 2 рази.

Активність ММП-2 в КМ тварин із карциномою Герена після контактної інкубації його клітин з ПК як на межі контакту, так і на відстані 1 см від неї практично не змінилася. При цьому концентрація активної ММП-2 в ПК, які контактували з клітинами КМ, зменшилася порівняно з вихідними значеннями (в ПК до інкубації *in vitro*) у 4 рази. Після кокультивування активність цієї желатинази в ПК була в 11 разів нижчою ($p < 0,001$), ніж у контактних клітинах КМ (див. таблицю).

Активність ММП-9 в клітинах КМ інтактних тварин після їх контактної інкубації з ПК зросла в 5 разів як на межі контакту, так і на відстані 1 см від нього; одночасно концентрація активної ММП-9 в коінкубованих клітинах карциноми Герена знизилася у 6 разів порівняно з вихідними значеннями. Після контактної інкубації з ПК клітин КМ тварин із карциномою Герена концентрація в них активної ММП-9 зросла у 2 рази на межі з контактом, але зменшилася у 2,5 раза на відстані 1 см від нього; рівень ММП-9-активності в ПК порівняно з вихідним дещо знизився, але різниця недостовірною (див. таблицю). У контрольних зразках (за відсутності контакту між клітинами КМ та ПК) не виявляли значних (достовірних) змін активності ні ММП-2, ні ММП-9.

Таким чином, до інкубації активність желатиназ реєстрували в КМ як інтактних, так і шурів із пухлиною, але в КМ останніх — на значно вищому рівні, що, вочевидь, свідчить про активацію ферментів в КМ, яка відбувається в організмі тварин під впливом пухлини. У клітинах інтактного КМ в результаті первинного контакту з ПК *in vitro*, концентрації активних форм ММП-2 та -9 значно зростають

(у 14 і 5 разів відповідно). Упродовж контактної інкубації з ПК *in vitro* клітин КМ тварин із карциномою Герена подальша активація желатиназ відбувається значно повільніше (зростає в 1,1 і 2 рази відповідно). Водночас, активність ферментів у ПК, інкубованих із клітинами КМ, значно знижується, тобто відбувається своєрідне «перенесення» активності желатиназ від ПК до клітин КМ. На нашу думку, цей феномен моделює один зі шляхів створення пухлиною в організмі сприятливих умов для формування метастатичних центрів у віддалених органах і тканинах. Отримані результати підтверджують інформацію інших дослідників щодо здатності злоякісних пухлин до створення умов для дисемінованих ПК шляхом формування відповідного мікрооточення у місцях майбутнього віддаленого метастазування, зокрема через активацію ММП [7, 8, 9].

Отже, взаємодія ПК з клітинами строми є вирішальним фактором у прогресуванні пухлинного процесу. Вплив пухлини на строму (в тому числі в КМ) можна охарактеризувати як локальне накопичення у позаклітинному матриксі її біологічно активних речовин, які можуть модулювати метаболізм мітохондрій клітин строми та ініціювати нерегульоване генерування супероксидних радикалів й активацію ММП. Виходячи з цього, визначення рівнів генерування супероксидних радикалів та активності ММП в нормальних тканинах хворих на рак може бути корисним при розробці методів оцінки ризику раннього метастазування.

ВИСНОВКИ

Пухлина продукує метаболіти, зокрема комплекси «вільного заліза», які мають прооксидантні властивості. При порівняльному дослідженні зразків КМ хворих на РМЗ (T2–4N1–2M0–1) і пацієнтів без онкологічної патології, а також КМ шурів з карциномою Герена й інтактних тварин показано, що продуковані пухлиною комплекси «вільного заліза» можуть дифундувати, зокрема, в строму і паренхіму КМ.

Продуковані пухлиною комплекси «вільного заліза» підвищують швидкість генерування супероксидних радикалів та активують деградацію міжклітинного матриксу в КМ, завдяки чому створюються відповідні (схожі з власне пухлиною за рівнем окиснення і активністю ММП) умови для розповсюдження та виживання дисемінованих ПК.

Наявність аномальних показників генерування супероксидних радикалів та активності ММП в нормальних тканинах може означати присутність віддалених, клінічно невиявлених метастазів; визначення таких показників може стати частиною діагностичних технологій та терапевтичних схем.

Роботу виконано за темою 2.2.5.365 «Роль мікрооточення пухлинних клітин у контролі організмом поведінки «прихованих» мікротастазів» за фінансування в рамках цільової програми наукових досліджень «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» НАН України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol* 2000; **11**: 785–92.
2. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the «leukemic phase» of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006; **12**: 130–9.
3. Pantel K, Woelfle U. Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anticancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1756**: 53–64.
4. Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 2006; **94**: 8–12.
5. Ring I, Smith E, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004; **5**: 79–88.
6. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* 2006; **13**: 1033–67.
7. Muller MM, Fusenig NE. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev* 2004; **4**: 839–49.
8. Aboukhatwa E. Protease Enzymes and Cancer Metastasis. *Breast Cancer* 2011; **6** (1): 6–8.
9. Hoffman UB, Eggert AA, Blass K, et al. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res* 2003; **63**: 8221–5.
10. Ганусевич ПІ, Гуменюк ЛД, Мамонтова ЛА та ін. Пухлиноасоційовані макрофаги та вміст активних форм желатинази у тканині раку шлунка: зв'язок з виживаністю хворих. *Онкологія* 2013; **15** (1): 14–9.
11. Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, et al. The causes of cancer revisited: «mitochondrial malignancy» and ROS-induced oncogenic transformation — why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2010; **31**(2): 145–70.
12. Schmid MC, Varner J. Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. *J Oncol* 2010; **10**: 288–94.
13. Ria R, Reale A, De Luisi A, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Am J Blood Res* 2011; **1** (1): 76–89.
14. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; **417** (1): 1–13.
15. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC Medicine* 2011; **9** (62): doi:10.1186/1741–7015–9–62.
16. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more or to be mined. *Nar Rev Cancer* 2013; **13** (5): 342–55.
17. D'Autréaux B, Toledano M. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *B. Mol Cell Biol* 2007; **8**: 813–24.
18. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США/ Под ред.: ЗП Софьиной, АБ Сыркина, А Голдина, А Клейна/ Москва: Медицина 1980, 296 с.
19. Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; **19** (3): 219.
20. Burlaka AP, Sidorik EP. Radical forms of oxygen and nitrogen oxide in the tumour process. Kyiv: Naukova dumka 2006, 228 p.
21. De Clerk YA, Perez N, Shimada H, et al. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; **52**: 701–8.
22. Kaplan RN, Raffi S, Lyden D. Preparing the «soil»: the pre-metastatic niche. *Cancer Res* 2006; **66**: 11089–93.
23. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; **438**: 820–7.
24. Okuyama N, Matsumine A, Kosugi R, et al. Matrix metalloproteinase-1 is a crucial bone metastasis factor in a human breast cancer-derived highly invasive cell line. *Oncol Rep* 2008; **20** (6): 1497–504.

25. Donadio AC, Durand S, Remedi MM, et al. Evaluation of stromal metalloproteinases and vascular endothelial growth factors in a spontaneous metastasis model. *Exp Mol Pathol* 2005; **79**: 259–64.

26. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, et al. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; **103**: 481–90.

REDOX-DEPENDENT MECHANISMS OF TUMOR INTERACTION WITH BONE MARROW

A.P. Burlaka, I.I. Ganusevich, S.M. Lukin, E.P. Sidorik

Summary. Activation of the generation systems of superoxide radicals with «free iron» complexes in the bone marrow (BM) is one of the mechanisms by which activation of matrix metalloproteinases (MMP) ensure dissemination of tumor cells (TC) in the organism — invasion and metastasis. **Objective:** comparative study of indexes content of «free iron» complex in BM of patients without oncological disease and patients with breast cancer (BC) with or without metastases, and experimental verification in vitro or in vivo of interrelation between the level of «free iron» complexes, generation of superoxide radicals and NO and MMP activity (especially MMP-2 and -9). **Object and methods:** the BM samples in 18 patients with breast cancer (T2–4N1–2M0–1) (study group) and 5 patients with polytrauma (control group) were investigated. In vivo studies were conducted in outbred male rats with transplanted Guerin carcinoma (20 animals, study group) and intact (10 animals, control group). Interaction of TC and BM cells of intact rats and animals with carcinoma was studied in a in vitro system cocultivating cells for 24 h. The used methods were: electron paramagnetic resonance (EPR) spin traps, zymography. **Results:** we found similar differences in the EPR spectra of BM patients and control group and animals with Guerin carcinoma and intact one, indicating accumulation in the BM as patients with breast cancer (especially M1) and rat tumor «free iron» complexes from prooxidant properties. In tumor tissue (Guerin carcinoma) was revealed increased output indicators of iron complexes compared with the BM, generation of superoxide radicals, activity of gelatinase MMP-2, -9. After cocultivating TC and BM cells in vitro in the cells of the BM (both intact rats and animals with tumor) the values increased as the limits contact with the TC as well as from it. **Conclusions:** effect on tumor BM (both in vivo, as in vitro, can be described as the accumulation of metabolites in the latter («free iron») that can trigger unregulated generation of superoxide radicals and activation of matrix metalloproteinases, which creates favorable conditions for dissemination TC. Therefore the determination of levels of generating superoxide radicals and MMP activity in normal tissues of cancer patients may be useful in developing methods for assessing the risk of early metastasis.

Key words: tumor, bone marrow, superoxide radicals, systems of «free iron», matrix metalloproteinases.

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: 31.07.2013