

Молекулярні предиктори відновлення функції оперованої печінки у хворих на метастатичний колоректальний рак

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

¹Національний інститут раку, МОЗ України

²Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Резюме. Патологічний ефект від хірургічного прийому ішемії-реперфузії (маневр Прінгла) є причиною розвитку пошкодження печінки та виникнення гострої печінкової недостатності в післяопераційному періоді в онкологічних хворих. Метою роботи є вивчення механізмів пошкоджуючого впливу резекції печінки, оцінка функціонального стану залишкової тканини печінки та пошук шляхів впливу на процеси регенерації оперованої печінки.

Вивчали результати лікування 15 хворих на метастатичний колоректальний рак із ураженням печінки(мКРР), яким виконали хірургічне лікування у період із грудня 2015 по листопад 2016 рр. на базі Національного інституту раку.

За результатами власних досліджень в тканинах культі печінки виявлено функціональне виснаження детоксикаційної спроможності гепатоцитів. Виявлено, що рівні окисленої та низькоспінової форм цитохрому Р-450 в каталітичному циклі системи детоксикації склали відповідно $0,33 \pm 0,08$ відн.од. та $1,11 \pm 0,13$ відн.од. (норма $0,59 \pm 0,03$ відн. од. і $2,56 \pm 0,02$ відн.од.). Рівень FeS-білка N-2 в цьому електронтранспортному комплексі склав $0,32 \pm 0,06$ відн. од. при нормі $0,61 \pm 0,09$ відн. од.

В залишковій тканині печінки виявлено зниження ефективності функціонування системи детоксикації та енергозабезпечення гепатоцитів. В гепатоцитах культі реєструється перепрограмування метаболізму мітохондрій з окисного фосфорилювання на гліколіз, наслідком чого є формування клітинної гіпоксії та зростання рівнів лактату і супероксидних радикалів. Оцінка ступеня ГПН в післяопераційному періоді можлива за допомогою визначення рівнів лактату, активність цитохрому Р-450, рівнів утворення комплексів NO з FeS-білками в електронтранспортному ланцюгу мітохондрій та швидкість генерування CP.

Вступ. В печінці функціонує механізм специфічного відновлення попереднього об'єму та функцій через короткий період з моменту її резекції чи пошкодження. Регенерація органу відбувається при резекціях чи трансплантації печінки, а також після токсичного її ураження. Процес регенерації печінки включає гіперплазію всіх типів клітин органу. Відомо, що реплікація гепатоцитів запускається з моменту виконання “великої” резекції печінки, а реплікація непаренхіматозних клітин (ендотеліальні, Купферівські та клітини жовчних протоків) активується дещо пізніше [3].

Інтенсивні дослідження у сфері регенерації печінки тривали останні два десятиліття, проте до цього часу невідомими залишаються механізми, що відповідають за відновлення об'єму печінки. Зрозуміло, що печінка підтримує чіткий баланс між зменшенням та надлишком паренхіми шляхом регулювання процесів росту. Отримані нещодавно результати клінічних та експериментальних досліджень з вивчення патофізіології оперованої печінки не розкривають процеси печінкової недостатності та регенерації [4].

Патологічний ефект від хірургічного прийому ішемії-реперфузії (маневр Прінгла) є причиною розвитку пошкодження печінки та виникнення гострої печінкової недостатності в післяопераційному періоді в онкологічних хворих як при “великих” резекціях, так і при трансплантаціях. Незважаючи на актуальність проблеми, більшість патологічних процесів, що супроводжують вищевказані стани досліджені недостатньо.

Метою цієї роботи є вивчення механізмів пошкоджуючого впливу резекції печінки, оцінка функціонального стану залишкової тканини печінки та пошук шляхів впливу на процеси регенерації оперованої печінки, що у майбутньому дозволить зробити хірургію безпечнішою. Розуміння механізмів регенерації печінки дозволить корегувати та попереджати гострі стани при токсичному чи інфекційному ураженні органу.

Матеріал та методи дослідження. Вивчали результати лікування 15 хворих на метастатичний колоректальний рак із ураженням печінки(мКРР), яким виконали

хірургічне лікування у період із грудня 2015 по листопад 2016 рр. на базі Національного інституту раку (табл. 1). Пацієнти отримували хіміотерапію згідно із затвердженими міжнародними та вітчизняними стандартами, а також клінічними протоколами на період проведення досліджень.

Таблиця 1

Характеристика хворих

Показники	Кількість (n)
<i>Локалізація первинної пухлини (пряма кишка/ободова кишка)</i>	3/12
<i>Одномоментні/двохетапні резекції</i>	2/13
<i>Синхронні/метахронні метастази в печінку</i>	1/14
<i>Метастази в інших локалізаціях на момент резекції печінки:</i>	4
<i>Легені</i>	3
<i>Черевна порожнина</i>	1
<i>ПХТ до операції на печінці (кількість курсів):</i>	14
<i>FOLFOX-6 (≤3)</i>	4
<i>FOLFOX-6 (>3)</i>	3
<i>XELOX(≤3)</i>	2
<i>XELOX (>3)</i>	3
<i>FOLFIRI(≤3)</i>	2
<i>Стан хворого за шкалою ASA:</i>	
<i>I-II</i>	11
<i>III</i>	3
<i>Кількість видалених сегментів печінки:</i>	
<i>≤3</i>	2
<i>>3</i>	12
<i>Тривалість ішемії-реперфузії (сер. значення±СП), (хв.)</i>	31,2±9,6
<i>Тривалість оперативного втручання (сер. значення±СП) (хв.)</i>	154,8±19,2

До протоколу хірургічного втручання входило проведення на печінці інтраопераційного ультразвукового дослідження та дотримання принципів анатомічних резекцій. Структури воріт печінки обробляли за методом “Extra-Glissonian approach”. Транссекцію паренхіми печінки здійснювали з використанням методики “Clamp-crush”, ультразвукового диссектора, моно- і біполярного коагуляторів.

Зразки паренхіми культі печінки забирались під час та після оперативного втручання не пізніше 1 год з моменту завершення резекції. Лактат в тканині печінки визначали спектрофотометрично. Визначення стану детоксикуючої функції гепатоцитів, спряження біологічного окиснення з фосфорилуванням в мітохондріях

проводили методом електронного парамагнітного резонансу(ЕПР) при температурі рідкого азоту. Для цього 500 мг тканини печінки вводили у спеціальну прес-форму і заморожували в рідкому азоті. Отримані зразки досліджували на комп'ютеризованому спектрометрі ЕПР PE-1307. Якісні і кількісні зміни в функціонуванні електронтранспортному ланцюгу мітохондрій визначали за розташуванням сигналів ЕПР (g-фактор спектроскопічного розщеплення), а також вимірювали амплітуду відповідного сигналу в контрольних і дослідних взірцях тканин. Досліджувався стан FeS-білків в першому електронтранспортному 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 по формуванню триплетного сигналу (g-фактор 2,007). Стан системидетоксикації в гепатоцитах оцінювали по активності цитохрому P-450 (g-фактор 2,25 і 2,42).

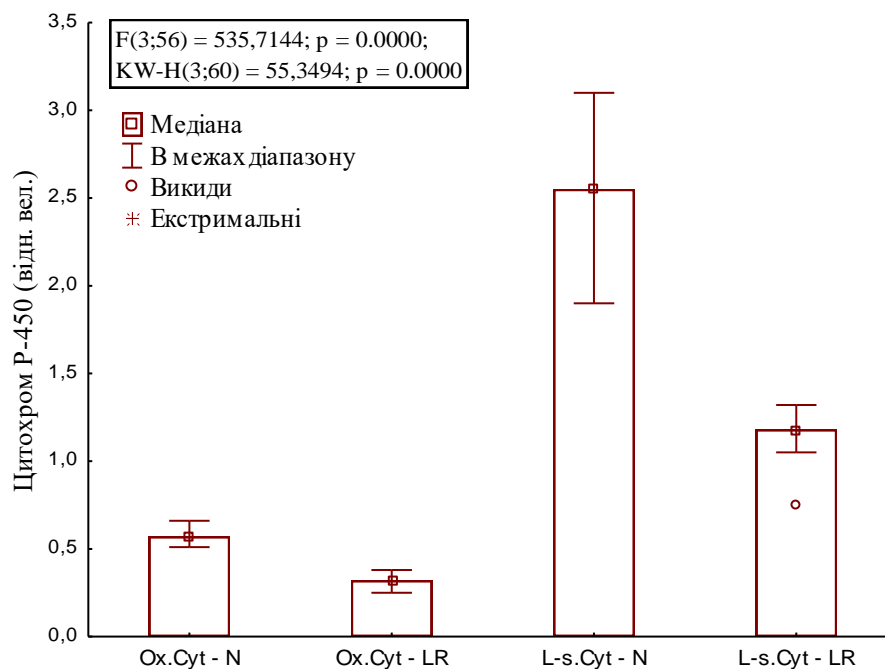
Статистичний аналіз даних проводили за пакетом SPSSStatistics. Нормальність розподілу змінних перевіряли тестом Шапіро—Вілка. За критичний рівень значущості під час перевірки статистичних гіпотез приймали $p = 0,05$. Зважаючи на те що більшість параметрів мали розподіл, відмінний від нормального, для опису вибіркового розподілу вказували медіану (Me) та нижній (25 %) і верхній (75 %) квартилі: Me [25 %; 75 %]. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали $p = 0,05$.

Результати та їх обговорення. Клітини печінки, зокрема гепатоцити являються дуже чутливими до ішемічних умов існування. Відомо, що ішемія-реперфузія часто є одним з основних факторів виникнення гострої печінкової недостатності при "великих" резекціях печінки, особливо при нормометричній ішемії. Більшість патологічних змін, що виникають в гепатоцитах за аноксичних умов виявляють саме в мітохондріях. Порушення метаболізму O_2 в дихальному ланцюгу мітохондрій призводить до змін транспорту електронів та мітохондріального дихання. За таких умов відбувається різке зниження продукування піримідинових нуклеотидів, що в свою чергу призводить до зростання накопичення рівнів внутрішньоклітинного NADH/NAD⁺. Зміни в процесах окисного фосфорилування веде до активації деплеції внутрішньоклітинного АТФ, прискорення гліколізу, наростання рівнів лактату і впливу H⁺, Na⁺ та Ca²⁺ на гомеостаз. Вищеописані

патологічні зміни призводять до важких розладів функції гепатоцитів та печінки в цілому в післяопераційному періоді.

В свою чергу реперфузія викликає пошкодження клітин продуктами неповного відновлення кисню-радикальними формами кисню (РФК), зокрема супероксидним радикалами при повторному надходженні O_2 в ішемізовані тканини. РФК продукуються як в середині клітин (мітохондріями) так і позаклітинними джерелами (NOX, iNOS нейтрофілів, тромбоцитів, лімфоцитів) [7].

За результатами власних досліджень в тканинах культу печінки виявлено функціональне виснаження детоксикаційної спроможності гепатоцитів. Виявлено, що рівні окисленої та низькоспінової форм цитохрому P-450 в каталітичному циклі системи детоксикації склали відповідно $0,33 \pm 0,08$ відн.од. та $1,11 \pm 0,13$ відн.од. (норма $0,59 \pm 0,03$ відн. од. і $2,56 \pm 0,02$ відн.од.), (рис.1).



Ріс. 1. Стан детоксикаційної системи гепатоцитів у хворих на мКРР після резекції печінки. Ox. Cyt – окиснений цитохром. L. Sp. Cyt – низькоспіновий цитохром. N – показники тканини печінки в нормі (літературні дані). LR – показники тканини печінки після її резекції.

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

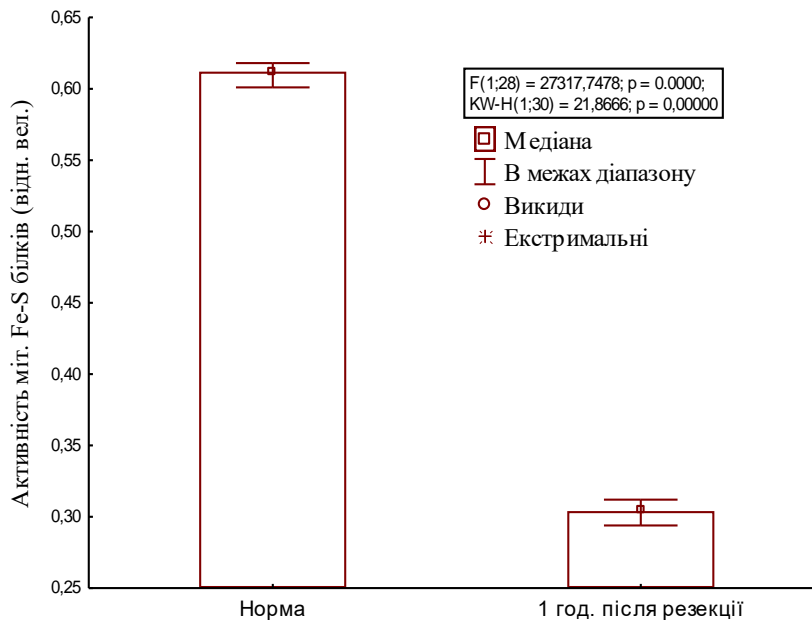


Рис.2. Стан електронотранспортного ланцюга мітохондрій гепатоцитів печінки у хворих на мКРР (через 1 год. після виконання резекції печінки та в нормі).

Також було зареєстроване зростання рівнів утворення комплексів NO-FeS-білків до значень $0,33 \pm 0,08$ відн. од. (норма $0,14 \pm 0,07$). Вважаємо, що такі зміни є причиною порушення енергетичної функції мітохондрій та формування клітинної гіпоксії, що корелює з зростанням рівнів лактату в тканині культури печінки до рівнів $> 2,00$ мкМ/г-тканини при нормі $1,80 \pm 0,26$ мкМ/г-тканини і підтверджує факт функціонування гепатоцитів в умовах гіпоксії.

Провідна роль в регулюванні метаболізму в міжклітинному матриксі паренхіми печінки також належить СР. Останні є редокс-залежними молекулами, що активно регулюють виникнення та розвиток патологічних процесів. Такі властивості СР можуть змінюватись в динаміці патологічних процесів, так само як і сама структура міжсистемних взаємодій. СР здатні проявляти не тільки цитотоксичні властивості, але і можуть виступати в якості вторинних месенджерів, приймаючи участь в підтримці фізико-хімічних властивостей біологічних мембран, регуляції внутрішньоклітинних редокс-систем, активності протеїназ та проліферації, диференціюванні, апоптозу. В останні роки фахівці закордонні передових експериментальних та клінічних онкологічних центрів публікують докази важливості СР та їхньої ключової ролі при регулюванні міжклітинного матриксу та матриксних металопротеїназ. Процеси надрегулювання біологічних структур СР носять циклічний характер, оскільки порушення мікроциркуляції і транскапілярного обміну викликають тканинну гіпоксію та активують ряд ангіогенних факторів,

металопротеїнази (ММП-2 та ММП-9), TNF- α , TNF- β , що відображається на балансі анти- і прозапальних цитокінів.

Мітохондрії контролюють виробництво енергії, метаболізм, активацію запрограмованої клітинної смерті, а також ряд клітинних специфічних функцій, зокрема, клітинну сигналізацію і синтез ряду важливих біомолекул. Нормалізація функції мітохондрій має вирішальне значення для функціонування і виживання клітин, а її зміни, тобто, мітохондріальна дисфункція призводить до патологічних станів. Мітохондріальна дисфункція є ключовою проблемою в розвитку поліорганної недостатності у оперованих хворих на фоні невідкладних станів та за умов проведення інтенсивної терапії. Тим не менш, є дві основні причини, чому цей факт не отримав адекватної оцінки у клініцистів. По-перше, основні результати про виникнення мітохондріальної дисфункції в клітинах органів, сприйнятливих до пошкоджень мітохондрій (печінка, нирки, серце, легені, кишечник, головний мозок) отримані на тваринних моделях. По-друге, досі немає чіткої терапевтичної стратегії щодо корекції порушення функції цих органел клітини.

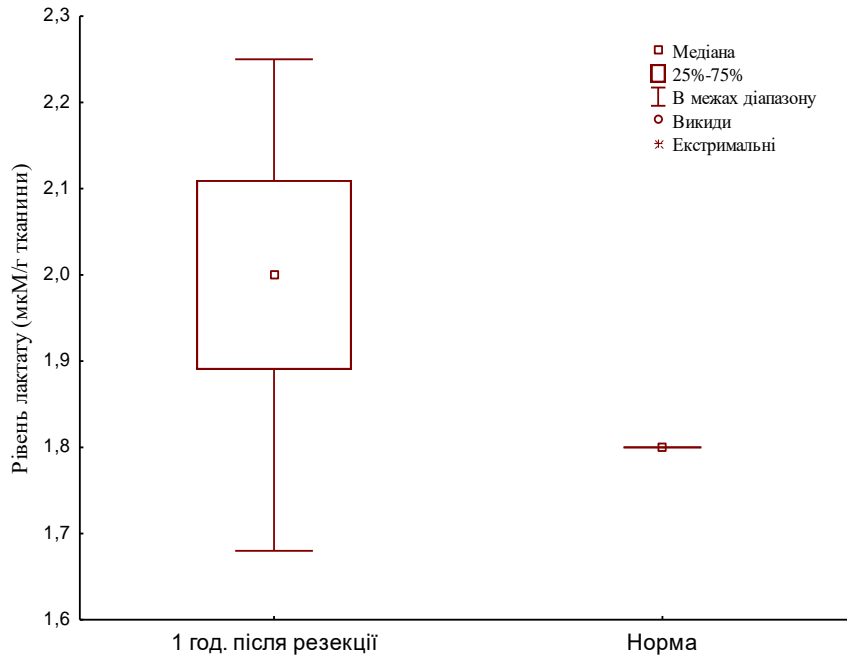


Рис. 3. Рівні лактату в тканині печінки після виконання резекції у хворих на МКРР (в нормі та через 1 год. з моменту виконання резекції).

Мітохондрії відіграють вирішальну роль в регулюванні загибелі клітин через апоптоз, особливо в гепатоцитах. Активація рецептору смерті індукує апоптоз за

участю каспази-8 шляхом порушення мітохондріальних мембранних FeS-білків, інактивації потоку електронів в ланцюзі транспорту електронів (ЕТЛ), що спричинює нерегульоване генерування в мітохондріях супероксидних радикалів і, нарешті, утворення апоптосоми. Ці дані свідчать про те, що дефекти в дихальному ланцюзі та надлишок вільних жирних кислот є ключовими факторами, що відбувається при ішемії/реперфузії при резекціях печінки. Мітохондріальна дисфункція посилюється зростанням рівнів генерування супероксидних радикалів (CP), які ініціюють формування самопосилюючого циклу утворення радикалів, що утворюються в результаті перекисного окислення ліпідів та пригнічують комплекси I/IV електротранспортного ланцюга. З іншого боку, CP пошкоджують мітохондральні ДНК та FeS-білки дихального ланцюга, що призводить до хронічного пошкодження органели. Підвищені рівні вільних жирних кислот в оперованій печінці активують цитохром P-450 в гепатоцитах (ізоформи CYP2E1 і CYP4A10/4A14). Останній бере участь в їх окисленні, що призводить до збільшення генерування CP та і наростання дисфункції мітохондрій.

Сигнальні шляхи регенерації та їх вплив на ріст і метастазування.

Повторне метастатичне ураження оперованої печінки є однією з основних онкологічних проблем її хірургії оскільки виникає у 40 – 60% у хворих на метастатичний колоректальний рак . Розширені резекції печінки з приводу метастазів раку шлунково-кишкового тракту супроводжуються ризиком активації неконтрольованого пухлинного росту у певної когорти хворих [1,7].

Відомо, що за нормальних умов, гепатоцити не діляться і перебувають в фазі G0. Після резекції або токсичного ураження печінки, вони входять в фазу G1. Такі зміни активуються шляхом зв'язування із рецепторами клітин печінки фактору некрозу пухлини α (TNF- α) та інтерлейкіну-6 (IL-6), останні вивільняються Купферівськими клітинами. Декілька молекулярних структур відповідають за активацію фактору росту гепатоциту (HGF), тим самим ініціюють перехід клітин із фази G1 у S, зокрема епідермальний фактор росту (EGF) та трансформуючий фактор росту α (TGF- α). Ці фактори стимулюють реплікацію ДНК та мітоз, взаємодіючи із відповідними рецепторами. Доведено, що TGF- β 1 викликає пригнічення проліферації гепатоцитів, тоді як в нормальній печінці фактор росту TGF- β має агоністичні ефекти. На початкових етапах регенерації сигнали HGF інтенсивніші у порівнянні з TGF- β , а в кінцевих стадіях регенерації відбувається

відновлення початкового балансу [3,4,7]. Фактор резекції печінки є потужним стимулом до її регенерації.

В останні роки з'явилися експериментальні дані в підтвердження того, що ефект ішемії/реперфузії може призводити до активації росту “прихованих” мікрометастазів в резектованій печінці [7]. Ініціація та прогресування пухлинного росту в печінці представляє собою багатофакторний молекулярний процес, що включає складні сигнальні шляхи (RAS/RAF-MAPK, фосфатидилинозитол-3 кіназу (PI3K)/AKT, WNT/ β -катенін, інсуліноподібний фактор росту (IGF), фактор росту гепатоцитів (HGF)/с-MET та фактори росту що активують шляхи ангіогенезу). Було виявлено, що клітинні та молекулярні зміни в післяопераційному періоді в хворих, що перенесли резекцію печінки (відповідь на хірургічний стрес, пошкодження внаслідок ішемії-реперфузії) можуть ініціювати кінетику пухлинного росту і тим самим викликати швидке прогресування [5]. Молекулярні фактори, що продукуються в тканині печінки внаслідок хірургічного стресу можуть відігравати роль потужного стимулу для пухлинного росту. Пострезекційна регенерація печінки активується мікрооточенням та різноманіттям факторів росту, цитокінів, що відповідають за ріст та активацію злоякісних клітин, (проліферацію, міграцію та неоангіогенез) [5]. Під час проліферації гепатоцитів діють ендокринні, аутокринні та паракринні процеси, які також можуть стимулювати сплячі мікрометастази та пухлинний ріст [5]. Одним з основних результатів хірургічного втручання в зоні культури печінки є швидке виділення CP, NO, TNF- α , TGF- β , HGF, EGF, інтерлейкіну 6, ангіогенних факторів, які модифікують мікрооточення сплячих пухлинних клітин та стимулюють агресивність росту та метастазування пухлини. Ріст пухлини є свого роду баланс між концентрацією факторів росту та цитокінів в мікрооточенні клітин, стимуляції неоангіогенезу [5,7]. Інгібітори ангіогенезу та білки позаклітинного матриксу і їх фрагменти виконують роль стабілізаторів стану “спокою” клітин пухлини.

В цьому розрізі також лежить проблема виникнення гострої печінкової недостатності (ГПН) при резекціях печінки перебуває в межах 1,2 – 32% і залежить від критеріїв селекції хворих та об'єму оперативного втручання [1]. Метаболічні та функціональні зміни, в тому числі і ГПН після резекції печінки є унікальними і часто стають критичною перешкодою для реаніматологів та лікарів-онкологів-хірургів як в ранньому післяопераційному періоді, так і більш пізніх термінах. Резекційний стрес вважається потужним імпульсом до регенерації печінки, регуляції її об'єму та росту,

а також атрофії. В свою чергу гемодинамічні зміни, що настають безпосередньо після резекції печінки потенціюють дію резекційного стресу та стимулюють генерування супероксидних радикалів (СР) та оксиду азоту (NO \cdot), які в свою чергу активують сигнальні каскади регенерації печінки. Вважається, що застосування повного чи часткового маневру Прингла під час “великих” резекції печінки дозволяє знизити крововтрату. Проте ефект I/P, що супроводжує таку хірургічну тактику може призводити до активації деструктивних каскадів молекулярних реакцій, медіаторами яких виступають СР, генеровані під час реперфузії із молекул O $_2$ до ішемізованих тканин печінки [4]. Отже клітинна регенерація печінки в ранньому післяопераційному періоді може бути стимулом до активації росту малих прихованих депозитів клітинних пухлин, які неможливо виявити за допомогою стандартних методів обстеження хворих в клініці.

Висновки.

В залишковій тканині печінки виявлено зниження ефективності функціонування системи детоксикації та енергозабезпечення гепатоцитів. В гепатоцитах культури реєструється перепрограмування метаболізму мітохондрій з окисного фосфорилування на гліколіз, наслідком чого є формування клітинної гіпоксії та зростання рівнів лактату і супероксидних радикалів. Оцінка ступеня ГПН в післяопераційному періоді можлива за допомогою визначення рівнів лактату, активність цитохрому Р-450, рівнів утворення комплексів NO з FeS-білками в електронотранспортному ланцюгу мітохондрій та швидкість генерування СР.

Вважаємо, що застосування інноваційних технологій може змінити стратегію терапії при ГПН та синдромі малої печінки. Особливу увагу необхідно приділити механізмам, які викликають загибель клітин і дисфункції органів і перспективним терапевтичним стратегіям, які спрямовані відновленню мітохондріальних функцій.

Список використаних джерел:

1. Гостра печінкова недостатність та її управління в ранньому післяопераційному періоді (огляд літератури) / А.А. Бурлака, А.В. Лукашенко, М.О. Волк, В.В. Приймак, Ю.О. Жуков, О.О. Колеснік // Клінічна хірургія. – 2016. – №5. – С. 34–37.
2. Extended preoperative chemotherapy, extent of liver resection and blood transfusion are predictive factors of liver failure following resection of colorectal liver metastasis / H.S.. Ribeiro, W.L. Costa, A.L. Diniz [et al.] / European Journal of Surgical Oncology (EJSO). – 2013. – Vol. 39. – P. 380 – 385.

3. Liver regeneration after partial hepatectomy:critical analysis of mechanistic dilemmas / Michalopoulos GK. // Am. J. Pathol. – 2010. Vol. 176. – P. 2 – 13.
4. Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions / A.W. Duncan [et al.] // Curr. Opin. Organ Transplant. – 2013. – Vol. 18 P. 197 – 202.
5. Recurrence of liver metastases from colorectal cancer and repeat liver resection / F. Navarro-Freire, P. Navarro-Sánchez, B. Mirón-Pozo [et al.] // Rev. Esp. Enferm. Dig. – 2015. - Vol. 12. - P. 732 – 739.
6. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation / P.A. Clavien, H. Petrowsky [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2007. - Vol. 356. – P. 1545 – 1559.
7. The Influence of Liver Resection on Intrahepatic Tumor Growth / H.H. Brandt, V. Nißle, R.S.Croner // J. Vis. Exp. – 2016. – Vol. 9(110). – P. 379 – 381.