

А.П. Бурлака¹
 І.І. Ганусевич¹
 В.В. Голотюк²
 А.В. Вовк¹
 С.М. Лукін¹
 С.В. Вірко³

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

²Івано-Франківський Національний медичний університет, Івано-Франківськ, Україна

³Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ

Ключові слова: рак прямої кишки, редокс-стан нейтрофілів, ефективність лікування.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК СУПЕРОКСИД-ТА NO-ГЕНЕРУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ З КЛІНІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ТА ВПЛИВ НА ВІДДАЛЕНІ РЕЗУЛЬТАТИ КОМБІНОВАНОГО ЛІКУВАННЯ

Нейтрофіли (Н) беруть участь у процесах формування і розвитку пухлини, стосовно якої вони можуть проявляти як про-, так і протипухлинну активність залежно від функціонального стану та етапу розвитку новоутворення. Ключового значення в регресії пухлин надають супероксидним радикалам (СР) та оксиду азоту (NO), які продукуються в тому числі Н. **Мета:** дослідити особливості редокс-стану Н крові хворих на рак прямої кишки (РПК) в умовах неоад'ювантної променевої терапії (НПТ) радіомодифікацією із застосуванням субстрату для біосинтезу NO та зв'язок цих параметрів із виживаністю пацієнтів. **Об'єкт і методи:** досліджено Н крові 59 хворих на РПК II–III (T2–3N0–2M0) стадії, які отримали доопераційний курс променевої терапії (I група), НПТ з потенціюванням тегафуром (II група) і НПТ на фоні полірадіомодифікації (III група) з подальшим хірургічним лікуванням через 4–5 тиж. Дослідження супероксид-генеруючої активності Н проводили методом електронного парамагнітного резонансу, NO-генеруючої активності — за допомогою технології Spin Traps. **Результати:** розвиток РПК супроводжується підвищенням у хворих супероксид-та NO-генеруючої активності Н відповідно в 1,5 і 4,3 раза. Виявлено пряму залежність активності НАДФ-Н-оксидази Н від розміру пухлини ($r = 0,54$; $p < 0,01$), а iNOS — від типу росту пухлини та метастатичного ураження регіонарних лімфовузлів (відповідно $r = 0,58$; $p < 0,05$; $r = 0,49$; $p < 0,05$). Середнє значення активності НАДФ-Н-оксидази Н після НПТ у хворих, які пережили 3-річний період без рецидивів, — $0,23 \pm 0,02$ нМ/10⁵ клітин·хв; у яких виникли місцеві рецидиви — $0,41 \pm 0,03$ ($p < 0,001$), а у випадках наявності віддалених метастазів — $0,53 \pm 0,04$ ($p < 0,001$). Прогностичне значення стосовно виникнення рецидивів і метастазів у хворих на РПК, які отримали комбіноване лікування, має показник активності цього ферменту після останньої фракції НПТ, при цьому значення швидкості генерування СР $< 0,31$ нМ/10⁵ клітин·хв є сприятливим прогностичним чинником, а більш високі показники — фактором негативного прогнозу. **Висновки:** застосування комплексу полірадіомодифікації з препаратом L-аргініну упродовж курсу НПТ зумовлює підвищення рівнів супероксид- та NO-генеруючої активності Н. Високі показники активності НАДФ-Н-оксидази Н є фактором негативного прогнозу виживаності хворих за умов комбінованого лікування.

ВСТУП

Нейтрофіли (Н) є неодмінними учасниками процесу формування і розвитку пухлини, стосовно якої вони можуть проявляти як про-, так і протипухлинну активність залежно від їх функціонального стану та етапу розвитку новоутворення [1–7]. Вони першими мігрують із периферичного кровотоку до пухлини на ранніх етапах її формування, посилено інфільтрують вогнища пухлинного росту і в подальшому функціонують як активні компоненти пухлинної стромы. Скупчуючись у зонах

найбільш інтенсивного пухлинного росту, Н мають здатність інгібувати поверхневу дифузію пухлинних клітин (ПК) [8, 9]. Вони здатні до фагоцитозу і безпосередньої цитотоксичності щодо ПК шляхом активації секреторної дегрануляції та респіраторного вибуху. При цьому ключового значення в регресії пухлин надають супероксидним радикалам (СР) та оксиду азоту (NO) [2].

Разом з цим є роботи, які свідчать, що цитотоксичний потенціал Н може сприяти прогресуванню пухлини, посилюючи процеси мутагенезу, неоангіо-

генезу та метастазування [5]. Зокрема, фактор некрозу пухлини (TNF)- α Н в умовах хронічного запалення створює сприятливі умови для ініціації розвитку пухлини; матриксні металопротеїнази-9 та -13, які секретуються інфільтруючими пухлину Н, стимулюють неоангіогенез та ремоделюють міжклітинний матрикс, сприяючи росту і метастазуванню пухлини [2, 6]. СР та NO, які продукуються Н, мають канцерогенний потенціал, збільшуючи кількість мутацій у клітинах через пошкодження ДНК, мембран, вплив на концентрацію внутрішньоклітинного кальцію [10]. Слід зазначити, що пропухлинна дія Н проявляється найчастіше на більш пізніх термінах росту пухлини [3, 4], а факторами, які визначають ефекти СР та NO на ПК, є їх концентрація та висока реакційна здатність [1, 7, 11].

Мета: вивчити особливості редокс-стану Н крові хворих на рак прямої кишки (РПК) в умовах полірадіомодифікації із застосуванням субстрату для біосинтезу NO та зв'язок цих параметрів із виживаністю хворих.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено Н крові 59 хворих (середній вік $61,8 \pm 1,1$ року) на РПК II–III стадії, які перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. У 41 пацієнта діагностовано II стадію захворювання (T3–4N0M0), у 18 — III (T2–4N1–2M0). У всіх пацієнтів була верифікована аденокарцинома різного ступеня диференціювання. Діагноз, стадію захворювання та наявність метастазів встановлювали відповідно до вимог доказової медицини (у ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно). Дослідження виконували згідно з принципами проведення біомедичних досліджень, що викладені в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації, за інформованою згодою пацієнтів.

I група — 22 пацієнти, що отримали курс неоад'ювантної променевої терапії (НПТ) на ділянку пухлини без застосування радіомодифікаторів (20 сеансів фракціями по 2 Гр до сумарної вогнищевої дози 38–40 Гр) з наступним хірургічним лікуванням. 18 хворих II групи на фоні аналогічного курсу НПТ отримували неоад'ювантну хіміопротерапію (НХПТ), тегафур із розрахунку 800 мг/добу за 2 прийоми *per os* (зранку та ввечері) при масі тіла до 70 кг або 1200 мг за 3 прийоми при масі тіла > 70 кг, щодня упродовж усього курсу НПТ. 19 пацієнтам III групи, окрім тегафуру як компонента полірадіомодифікації під час НХПТ, доведено інфузійно за 1 год до сеансу променевої терапії (ПТ) вводили препарат L-аргініну в дозі 100 мл (100 мл містять 4,2 г аргініну гідрохлориду; у 100 мл міститься 20 ммоль аргініну та 20 ммоль хлоридів). Через 4–6 тиж після останнього сеансу НПТ пацієнтам всіх груп були виконані радикальні хірургічні втручання в обсязі передньої резекції, черевно-анальної резекції чи черевно-промежнинної екстир-

пації прямої кишки. Ад'ювантну хіміотерапію згідно з режимами FOLFOX/FOLFIRI призначали хворим з III стадією патологічного процесу, у разі вrostання пухлини в сусідні органи, а також при ступенях диференціації G₃₋₄. У разі III стадії ад'ювантну хіміотерапію призначали, враховуючи негативні прогностичні фактори: кишкову непрохідність, перфорацію кишки, інвазію в кровоносні та лімфатичні судини, периневральну інвазію, позитивні краї резекції.

Н виділяли з венозної крові на розчині трилону Б (3%) за стандартною методикою на градієнті щільності фікол/натрію амідотризоат [12]. Дослідження O₂⁻-генеруючої активності НАДФ·Н-оксидази Н проводили методом електронного парамагнітного резонансу з використанням спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину при кімнатній температурі. Визначення NO, генерованого iNOS Н, виконували методом електронного парамагнітного резонансу та технології Spin Traps при температурі 77 К. Як спіновий уловлювач застосували діетилдитіокарбамат «Sigma» [13].

O₂⁻-генеруючу активність НАДФ·Н-оксидази та швидкість генерування NO індукційною NO-синтазою (iNOS) визначали на етапі встановлення діагнозу, після 1-го та 20-го сеансів НПТ і перед операцією. Контролем слугували показники 20 практично здорових людей (11 чоловіків, 9 жінок віком 50–58 років).

Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера, для парних порівнянь використовували *log-rank* критерій [14]. Статистичний аналіз проводили з використанням прикладних ліцензійних програм GraphPadPrism 6 та Origin 7.0. Різницю між показниками вважали достовірною при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При злякисному пухлинному рості активація Н реалізується за умов утворення функціональної НАДФ·Н-оксидази, яка після взаємодії цитозольних компонентів з мембранним флавоцитохромом b₅₅₈ продукує та переносить електрони на молекулярний кисень з утворенням СР. Нейтрофільні гранулоцити крові експресують так звану фагоцитарну форму НАДФ·Н-оксидази, яка має деякі структурні відмінності порівняно з нефагоцитарною НАДФ·Н-оксидазою тромбоцитів. Зокрема, каталітична субодинаця ферменту gp91^{phox} утворює мембранозв'язаний комплекс з субодинацею gp22^{phox}, формуючи флавоцитохром b₅₅₈, а крім цитозольних субодинаць p47^{phox}, p67^{phox} і Rac, притаманних для тромбоцитів, для активації фагоцитарної НАДФ·Н-оксидази необхідна транслокація до мембранного комплексу субодинаць p40^{phox}. При цьому генерування СР НАДФ·Н-оксидазою Н ініціюється прозапальними цитокінами (GM-CSF, IL-8), впливаючи на рівень G-білка або через активацію b₅₅₈ [7, 13].

При дослідженні активності НАДФ·Н-оксидази та iNOS Н у хворих на РПК до початку лікування ви-

явлено достовірне зростання швидкості генерування СР порівняно зі донорами (табл. 1).

Таблиця 1
Показники редокс-стану Н крові у донорів і хворих на РПК

Групи хворих	Показники редокс-стану Н	
	Активність НАДФ-Н-оксидази (нМ/10 ⁵ клітин·хв)	Активність іNOS (нМ/10 ⁵ клітин·хв)
	М ± m	М ± m
Умовно здорові донори (n = 20)	0,22 ± 0,03	0,09 ± 0,02
Хворі на РПК (n = 59)	0,34 ± 0,01 (p = 0,001)	0,39 ± 0,02 (p < 0,001)

Аналіз швидкості генерування СР Н крові залежно від клініко-патологічних характеристик хворих на РПК показав здебільшого неспецифічний характер її підвищення. Фактором, який достовірно впливав на активність НАДФ-Н-оксидази Н, був розмір пухлини (пряма кореляція: r = 0,54; p < 0,01) (табл. 2). Що стосується активності іNOS Н, статистичний аналіз виявив 2 фактори, які у хворих на РПК достовірно впливають на її рівень (див. табл. 2). Зокрема, у випадках пухлин з ендофітною та змішаною формами росту порівняно з екзофітною, а також у разі метастатичного ураження лімфатичних вузлів NO-генеруюча активність ферменту підвищувалася відповідно на 26% (пряма кореляція: r = 0,58; p < 0,05) та 25% (пряма кореляція: r = 0,49; p < 0,05).

Таблиця 2
Показники редокс-стану Н крові залежно від клініко-патологічних характеристик хворих на РПК

Фактор	Показники редокс-стану Н	
	Активність НАДФ-Н-оксидази (нМ/10 ⁵ клітин·хв)	Активність іNOS (нМ/10 ⁵ клітин·хв)
	М ± m	М ± m
Стать:		
чоловіки (n = 31)	0,35 ± 0,02	0,41 ± 0,03
жінки (n = 28)	0,32 ± 0,02 (p = 0,343)	0,37 ± 0,02 (p = 0,223)
Вікова група:		
≤ 60 років (n = 24)	0,34 ± 0,02	0,41 ± 0,03
> 60 років (n = 35)	0,33 ± 0,02 (p = 0,908)	0,38 ± 0,02 (p = 0,401)
Тип росту:		
екзофітна (n = 27)	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,03
змішана і ендофітна форми (n = 32)	0,33 ± 0,02 (p = 0,852)	0,43 ± 0,02 (p = 0,011)
Ступінь диференціювання:		
G1–2 (n = 49)	0,34 ± 0,02	0,39 ± 0,02
G3 (n = 10)	0,33 ± 0,04 (p = 0,924)	0,37 ± 0,05 (p = 0,663)
Глибина інвазії:		
T1–2 (n = 15)	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,03
T3–4 (n = 44)	0,34 ± 0,02 (p = 0,580)	0,41 ± 0,02 (p = 0,215)
Розмір пухлини:		
≤ 5 см (n = 17)	0,31 ± 0,03	0,37 ± 0,04
> 5 см (n = 42)	0,39 ± 0,02 (p = 0,027)	0,40 ± 0,02 (p = 0,581)
Регіонарні лімфовузли:		
N0 (n = 41)	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,02
N1–2 (n = 18)	0,36 ± 0,03 (p = 0,339)	0,45 ± 0,03 (p = 0,017)
Стенозування кишки:		
є (n = 35)	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,03
немає (n = 24)	0,34 ± 0,03 (p = 0,389)	0,41 ± 0,02 (p = 0,130)

У хворих дослідних груп рівні активності НАДФ-Н-оксидази Н на етапі до лікування між собою вірогідно не відрізнялися (рис. 1, а). Через добу після 1-го сеансу ПТ у хворих I та II груп активність ферменту достовірно знижувалася. У подальшому, поступово зростаючи, на етапі перед операцією в обох групах вона була близькою до показника до лікування, не відрізняючись достовірно від нього. Навпаки, у III групі активність НАДФ-Н-оксидази після 1-го сеансу ПТ різко зростала (у 2,2 раза, до 0,69 ± 0,06 нМ/10⁵ клітин·хв; p < 0,001), після 19–20-го сеансу знижувалася, при цьому залишаючись вірогідно вищою за показник до лікування (p = 0,037). На передопераційному етапі активність ферменту достовірно не відрізнялася від вихідного рівня. Через 1 міс після хірургічного лікування у I, II і III групах хворих активність НАДФ-Н-оксидази Н була нижчою відповідно на 33; 31 та 25%, ніж на етапі встановлення діагнозу, при цьому у пацієнтів I та II груп ця різниця була статистично достовірною.

Таким чином, вплив НПТ та хірургічного лікування у хворих I–II груп проявлявся у транзиторному зниженні супероксид-генеруючої активності Н. У хворих III групи застосування полірадіомодифікації під час ПТ зумовлювало підвищення активності НАДФ-Н-оксидази Н, хоча через 1 міс після хірургічного лікування статистично значущої відмінності зазначеного показника порівняно з пацієнтами II та III груп не виявлено.

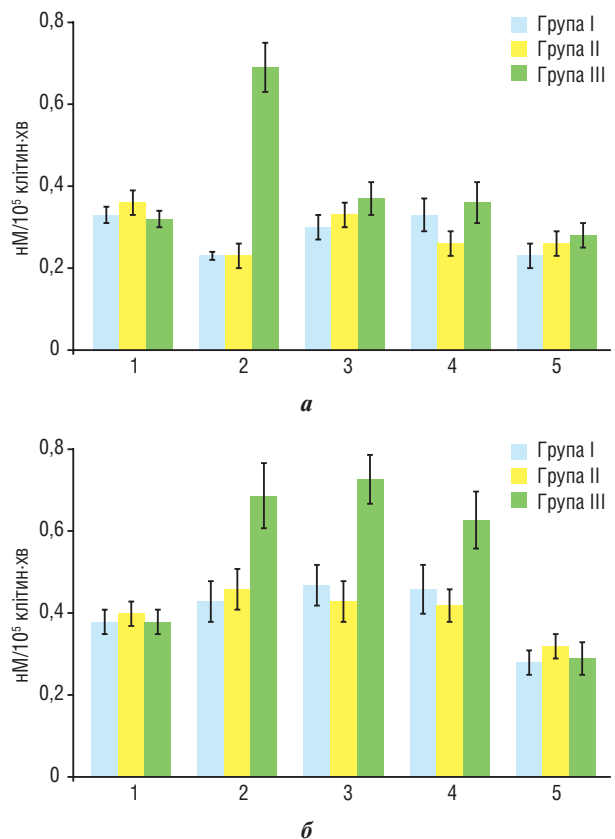


Рис. 1. Рівні генерування СР (а) та NO (б): 1 — до лікування; 2 — після 1-го сеансу НПТ; 3 — після 20 сеансів НПТ; 4 — перед операцією; 5 — через 1 міс після операції.

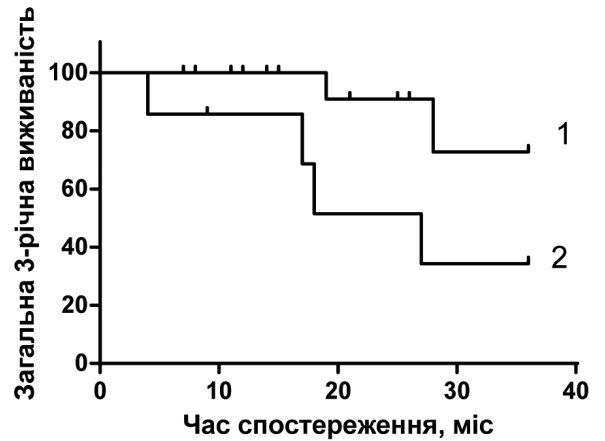
Показники активності iNOS у хворих I і II груп, не відрізняючись вірогідно між собою до початку лікування, через 1 добу після 1-го сеансу ПТ незначно та недостовірно зростали, в подальшому залишалися на практично такому самому рівні без особливої динаміки (рис. 1, б). Натомість, у хворих III групи активність iNOS підвищувалася упродовж всього курсу ПТ, перевищуючи вихідне значення після 19–20-го сеансу майже вдвічі ($p < 0,001$). Через місяць після операції в I, II і III групах хворих NO-генеруюча активність iNOS була нижчою, ніж на етапі встановлення діагнозу, проте статистично достовірно — лише у пацієнтів I групи.

Отримані дані вказують, що НПТ і НХПТ самі по собі мало впливають на процеси генерування NO. На фоні полірадіомодифікації з препаратом L-аргініну рівень продукції NO очікувано зростає, причому підвищення активності iNOS у цьому випадку спостерігається і через 4–5 тиж після закінчення ПТ.

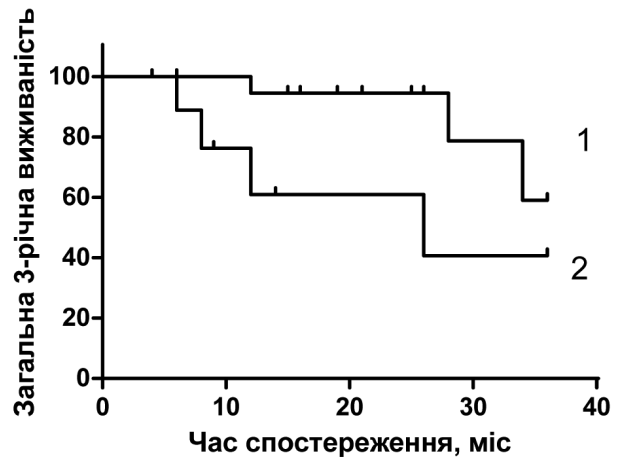
Аналіз результатів 3-річного спостереження пацієнтів досліджених груп показав, що прогностичне значення стосовно виникнення рецидивів і метастазів у хворих на РПК, які отримали комбіноване лікування, має показник активності НАДФ·Н-оксидази Н після останньої фракції ПТ. Ретроспективно встановлено, що середнє значення активності цього ферменту після 19–20-го сеансу ПТ у пацієнтів, які пережили 3-річний період без рецидивів, становило $0,23 \pm 0,02$ нМ/10⁵ клітин·хв; у хворих із місцевими рецидивами — $0,41 \pm 0,03$ ($p < 0,001$), а у випадках наявності віддалених метастазів — $0,53 \pm 0,04$ ($p < 0,001$). На основі ROC-аналізу встановлено, що межа розподілу між умовно «сприятливим» та «несприятливим» рівнями швидкості генерування СР ізольованими Н крові становить $0,31$ нМ/10⁵ клітин·хв. Зокрема, значення швидкості генерування СР $< 0,31$ нМ/10⁵ клітин·хв можна вважати сприятливим прогностичним фактором, який свідчить про високу чутливість до застосованого комбінованого лікування і дозволяє спрогнозувати більш високі показники виживаності хворих. Фактором негативного прогнозу за умов аналогічного лікування є показник $> 0,31$ нМ/10⁵ клітин·хв, що є додатковим чинником на користь застосування ад'ювантних курсів системної поліхіміотерапії [15]. Запропонована оцінка прогнозу ризику прогресування РПК справджується незалежно від методу НТП, на що вказує порівняння показників загальної 3-річної виживаності хворих у межах кожної дослідної групи (рис. 2).

Широкий спектр фізіологічної активності Н зумовлює їх суттєвий вплив як агентів стримування пухлинного росту [2, 7]. Зокрема, паракринний викид ними цитокінів TNF- α , IL-1 β , -2, -4, -12, INF- γ супроводжується інактивацією ПК, виділені цитокіни залучають у зону розвитку пухлини і активують супероксид- та NO-генеруючу активність макрофагів, природніх кілерів, дендритних клітин, Т-

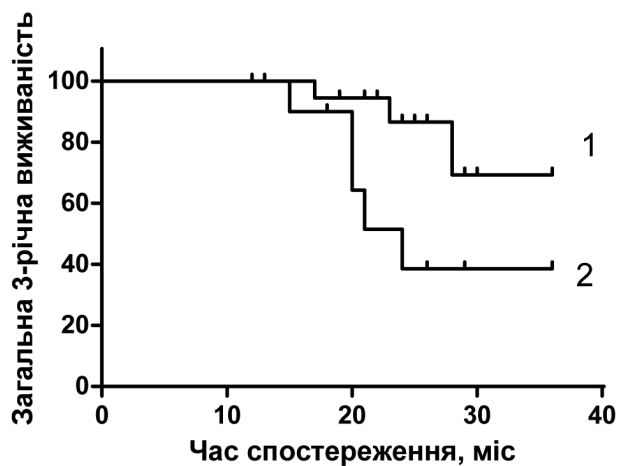
і В-лімфоцитів. Окрім того, СР, NO і хемокіни Н мають здатність гальмувати ангиогенез у пухлині й активувати Т-хелпери 1-го і 2-го типів, викликаючи зсув балансу між гуморальними і клітинно-опосередкованими реакціями [1, 8].



I група



II група



III група

Рис. 2. 3-Річна загальна виживаність хворих на РПК залежно від генеруючої активності Н після 20-го сеансу НПТ: 1 — $< 0,31$ нМ/10⁵ клітин·хв; 2 — $> 0,31$ нМ/10⁵ клітин·хв. Оцінка виживаності за Капланом — Мейером, log-rank тест при порівнянні загальної виживаності $p = 0,011$ (I група); $p = 0,036$ (II група); $p = 0,047$ (III група)

Активні форми кисню і NO, які синтезують ферментні системи N, здійснюють безпосередню деструкцію чужорідних агентів і ПК. Вони генеруються при активації комплексу функціональної НАДФ·Н-оксидази шляхом взаємодії цитозольних компонентів (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} та Rac2) з мембранним флавоцитохромом b₅₅₈ (gp91^{phox} та p22^{phox}) [7]. Супероксид-аніон, що генерується НАДФ·Н-оксидазою, є вихідним продуктом для утворення цілого спектра активних форм кисню, включаючи похідні азоту і галогенів, зокрема гіпохлорну кислоту. Остання викликає швидкий лізис ПК і утворює хлораміни, які володіють імуностимулюючими властивостями [1]. iNOS N після їх адекватної стимуляції прозапальними цитокінами (GM-CSF, IL-8) має здатність підтримувати високу концентрацію NO у навколишньому середовищі упродовж 36–94 год, що дозволяє здійснювати як пряму цитолітичну дію на клітини, так і брати участь в індукції механізмів апоптозу [10, 11]. Активні форми кисню, які продукуються N, можуть також активувати інгібітори протеїнкіназ, що, як і дія протеаз гранул N, призводить до елімінації ПК.

ВИСНОВКИ

1. Розвиток РПК супроводжується підвищенням супероксид- та NO-генеруючої активності N відповідно в 1,5 і 4,3 раза.

2. Встановлено пряму залежність активності НАДФ·Н-оксидази N від розміру пухлини, а iNOS — від типу росту пухлин та метастатичного ураження регіонарних лімфовузлів.

3. Застосування комплексу полірадіомодифікації з препаратом L-аргініну упродовж курсу НРТ зумовлює підвищення рівнів O₂^{·-} та NO-генеруючої активності N порівняно з іншими групами хворих.

4. Показник швидкості генерування CP N < 0,31 нМ/10⁵ клітин·хв вважають сприятливим прогностичним фактором, який свідчить про високу чутливість до застосованого лікування і дозволяє спрогнозувати більш високі показники виживаності хворих. Високі показники НАДФ·Н-оксидази є фактором негативного прогнозу за умов комбінованого лікування.

Роботу виконано у рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002193; 2012–2016 рр.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мальцева ВН, Сафронова ВГ. Неоднозначність ролі нейтрофіла в генезі опухолі. Цитологія 2009; **6**: 467–74.
2. Gregory AD, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. Cancer Res 2011; **71**: 2411–6.
3. Klink M, Jastrzemska K, Nowak M, et al. Ovarian cancer cells modulate human blood neutrophils response to activation in vitro. Scand J Immunol 2008; **68**: 328–36.

4. Wislez M, Antoine M, Rabbe N, et al. Neutrophils promote aegogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features. Clin Cancer Res 2007; **13**: 3518–27.

5. Knaapen AM, Gungor N, Schins RPF, et al. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. Mutagenesis 2006; **21**: 225–36.

6. Nozawa H, Chiu Ch, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse of multistage carcinogenesis. Proc Nat Acad Sci USA 2006; **103**: 12493–8.

7. Бурлака АП, Сидорик ЕП. Редоксзависимые молекулы в механизмах опухолевого процесса. К: Наукова думка, 2014. 255 с.

8. Granot Z, Henke E, Comen E, et al. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. Cancer Cell 2011; **20**: 300–14.

9. Bru A, Albertos S, Lopez Garcya-Asenjo JA, et al. Pinning of tumoral growth by enhancement of the immune response. Phys Rev Lett 2004; **92** (23): 238101.

10. Grimm EA, Sikora AG, Ekmekcioglu S. Molecular pathways: inflammation-associated nitric-oxide production as a cancer-supporting redox mechanism and a potential therapeutic target. Clin Cancer Res 2013; **20**: 5557–63.

11. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, et al. Nitric oxide and cancer: a review. World J Surg Oncol 2013; **11**: 118.

12. Ковальчук ЛВ, Игнатъева ГА, Ганковская ЛВ. Иммунология, практикум. М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 194 с.

13. Бурлака АП, Голотиук ВВ, Вовк АВ *ma in*. Вплив O₂^{·-} та NO-генеруючої активності нейтрофілів на ефективність неoad'ювантної променевої терапії у хворих на рак прямої кишки. Онкологія 2015; **4**: 253–7.

14. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Amer Stat Ass 1958; **53**: 457–81.

15. Голотиук ВВ, Бурлака АП. Патент на корисну модель № 102389 UA: «Спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням супероксид-генеруючої активності нейтрофілів».

CORRELATION BETWEEN SUPEROXIDE- AND NO-GENERATING ACTIVITY OF NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER AND CLINICAL CHARACTERISTICS AND IMPACT ON THE LONG-TERM RESULTS OF COMBINED TREATMENT

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

Summary. Neutrophils (N) are involved in processes of formation and development of tumor, and towards they can exhibit both pro- and anti-tumor activity depending on the functional status and stage of neoplasm development. A crucial importance for tumor regression belongs to superoxide radicals (SR) and nitrogen oxide (NO), produced also by N. **Aim:** to explore features of redox state of N in blood of patients with colorectal cancer (CRC) under conditions of neoadjuvant radiation therapy with radiomodification (using substrate for biosynthesis of NO) and the correlation of these parameters and survival of patients. **Object and methods:** N of blood of 59 patients with CRC stages II–III (T2–3N0–2M0) were investigated. These patients received preoperative radiotherapy (NRT) (I group), NRT with tegafur potentiation (II group) and NRT on the background of polyradiomodification (III group), followed by a surgery af-

ter 4–5 weeks. Superoxide-generating activity of N was investigated using EPR method, and NO-generating activity — using spin trapping technique. **Results:** development of CRC is accompanied by an increase in superoxide- and NO-generating activity of N 1,5 and 4,3 times, respectively. A direct dependence of activity of NADP·H-oxidase of N on the tumor size ($r = 0.54$; $p < 0,01$) and of iNOS — on the type of tumor growth and metastatic lesion of regional lymph nodes ($r = 0.58$; $p < 0.05$; $r = 0.49$; $p < 0.05$, respectively) have been revealed. The average value of activity of NADP·H-oxidase of N after NRT in patients, who have survived 3-year period without recurrence, was $0.23 \pm 0.02 \text{ nm}/10^5 \text{ cells} \cdot \text{min}$; in patients with local R — 0.41 ± 0.03 ($p < 0.001$); in the cases with distant metastases — 0.53 ± 0.04 ($p < 0.001$). Index of activity of this enzyme after the last NRT fraction has prognostic significance concerning the occurrence of recurrence and metastases in patients with CRC, who received the combined treatment. Moreover, the value of SR generation rate $< 0.31 \text{ nm}/10^5 \text{ cells} \cdot \text{min}$ is a favor-

able prognostic factor, while the higher value is a factor of negative prognosis. **Conclusions:** the use of complex of polyradiomodification with a preparation of L-arginine during NRT course causes an increase in levels of superoxide- and NO-generating activity of N. High rate of activity of NADP·H-oxidase of N is a factor of negative prognosis of survival of patients under conditions of combined treatment.

Key Words: colorectal cancer, redox state of neutrophils, effectiveness of treatment.

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: 16.11.2016