

А.П. Бурлака<sup>1</sup>  
В.В. Голотюк<sup>2</sup>  
А.В. Вовк<sup>1</sup>  
С.М. Лукін<sup>1</sup>  
Є.П. Сидорик<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:** рак прямої кишки, нейтрофіли, НАДФ·Н-оксидаза, індукцибельна NO-синтаза, неoad'ювантна променева терапія, тегафур.

## ВПЛИВ $O_2^{\cdot-}$ - ТА NO-ГЕНЕРУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

**Мета:** вивчити особливості генерування супероксидних радикалів ( $O_2^{\cdot-}$ ) та оксиду азоту (NO) нейтрофілами крові хворих на рак прямої кишки (РПК) та зв'язок цих параметрів із виживаністю. **Об'єкт і методи:** досліджено нейтрофіли, виділені з крові 58 хворих на РПК II–III стадії та 20 здорових донорів. Визначення  $O_2^{\cdot-}$ - та NO-генеруючої активності нейтрофілів проводили методом електронного парамагнітного резонансу з використанням технології спінових уловлювачів. **Результати:** у більшості хворих на РПК виявлено високі рівні  $O_2^{\cdot-}$ -генеруючої активності нейтрофілів. При проведенні неoad'ювантної променевої терапії (НПТ) та НПТ з одночасним введенням радіомодифікатора спостерігали транзиторне зниження  $O_2^{\cdot-}$ -генеруючої активності нейтрофілів в обох групах пацієнтів. У хворих I групи, які одержали лише курс НПТ, рівень  $O_2^{\cdot-}$  на момент операції знову зростав, перевищуючи медіану показника ( $> 0,31 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$ ). У пацієнтів, які на фоні НПТ отримували тегафур (II група), активність генерування  $O_2^{\cdot-}$  хоч і підвищилася, але не досягла медіани ( $< 0,31 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$ ). Зареєстровано достовірне зниження NO-генеруючої активності нейтрофілів на всіх етапах дослідження (до початку лікування, під час НПТ, перед операцією). Загальна та безрецидивна виживаність пацієнтів, у яких до початку лікування рівень активності НАДФ·Н-оксидази був нижчим за медіану ( $< 0,31 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$ ), виявилася статистично достовірною кращою, ніж у пацієнтів із вищою активністю генерування  $O_2^{\cdot-}$  ( $> 0,31 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$ ) за обох схем передопераційного лікування. **Висновок:** моніторинг супероксид-генеруючої активності нейтрофілів у хворих на РПК може бути додатковим показником прогнозування ефективності лікування.

### ВСТУП

Нейтрофіли першими мігрують із периферичної крові до пухлини після ініціації розвитку останньої та є активними компонентами строми в зонах інтенсивного росту. Їм властива швидка активація метаболічних процесів і мобілізація, що робить їх ефективними щодо пошкодження клітин пухлини супероксидними радикалами ( $O_2^{\cdot-}$ ) та оксидом азоту (NO). Однак інфільтрація пухлини нейтрофілами може сприяти її прогресуванню, селекції більш злоякісних варіантів пухлинних клітин, посиленню ангіогенезу та метастазуванню. Факторами, які визначають ефекти  $O_2^{\cdot-}$  та NO на пухлинні клітини, є їх концентрація та висока реакційна здатність [1–7].

Мета дослідження: вивчити особливості генерування супероксидних радикалів та оксиду азоту нейтрофілами крові хворих на рак прямої кишки (РПК) та зв'язок цих параметрів із виживаністю.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено нейтрофіли периферичної крові 58 хворих (середній вік  $64,0 \pm 1,6$  року) із діагнозом аденокарцинома прямої кишки II–III стадії, які перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. У 34 пацієнтів діагностовано II стадію захворювання (T3–4N0M0), у 24 — III (T2–4N1–2M0). У всіх пацієнтів була верифікована аденокарцинома помірного ступеня диференціювання. Діагноз, стадію захворювання та наявність метастазів встановлювали згідно з вимогами доказової медицини (у ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно). Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень за згодою пацієнтів, що викладені в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації.

І групу сформували 35 пацієнтів, що отримали курс неoad'ювантно́ї променевої терапії (НПТ) на ділянку пухлини без застосування радіомодифікаторів (20 сеансів фракціями по 2 Гр до сумарної вогнищевої дози 40 Гр) з наступним хірургічним лікуванням через 4–6 тиж. 23 хворих ІІ групи на фоні аналогічного курсу НПТ отримували хіміо-радіомодифікацію препаратом 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 більше 70 кг щодня упродовж усього курсу НПТ. Пацієнтам обох груп були виконані подібні хірургічні втручання в аналогічні терміни.

Нейтрофіли виділяли з венозної крові на розчині трилону Б (3%) за стандартною методикою на градієнті щільності фікол-верографін [8]. Дослідження  $O_2^{\cdot-}$ -генеруючої активності НАДФ·Н-оксидази нейтрофілів проводили методом електронного парамагнітного резонансу з використанням спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину при кімнатній температурі. Визначення NO, генерованого індукційною NO-синтазою (iNOS) нейтрофілів, виконували методом електронного парамагнітного резонансу та технології Spin Traps при температурі 77 К. Як спіновий уловлювач застосовували діетилдитіокарбамат «Sigma» [9].

$O_2^{\cdot-}$ -генеруючу активність НАДФ·Н-оксидази та швидкість генерування NO індукційною NO-синтазою (iNOS) визначали на етапі встановлення діагнозу, після 1-го та 20-го сеансу НПТ і перед операцією (через 4–5 тиж після закінчення НПТ). Контролем слугували визначені за аналогічними методиками показники 20 практично здорових людей (11 чоловіків та 9 жінок віком 50–58 років).

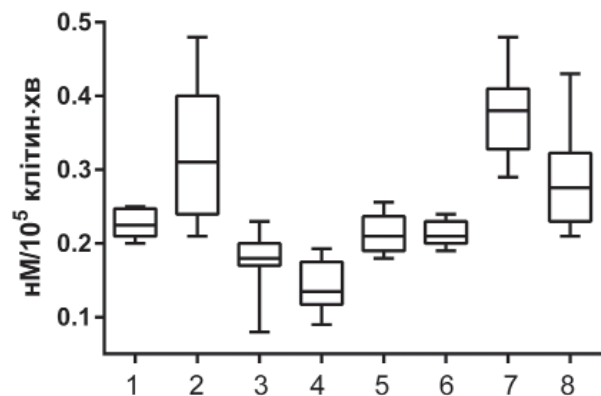
Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера, для парних порівнянь використовували *log-rank* критерій [10]. Статистичний аналіз проводили з використанням прикладних ліцензійних програм GraphPadPrism 6 та Origin 7.0. Різницю між показниками вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що генерування  $O_2^{\cdot-}$  нейтрофілами відбувається після активації НАДФ·Н-оксидази — багатоконпонентного білкового комплексу, який продукує та переносить електрони на молекулярний кисень з утворенням супероксидних радикалів.

На рис. 1 наведено дані щодо швидкості генерування  $O_2^{\cdot-}$  НАДФ·Н-оксидазою нейтрофілів у хворих на РПК. У 16 (28%) пацієнтів до початку лікування активність генерування  $O_2^{\cdot-}$  нейтрофілами в середньому становила  $0,24 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв і була близькою до показників донорів ( $0,23 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв). У більшості хворих ( $n = 42$ ; 72%) до лікування цей показник був підвищений і перебував у межах  $0,25$ – $0,48$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв ( $0,36 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ). У підгрупі з незміненою швидкістю генерування

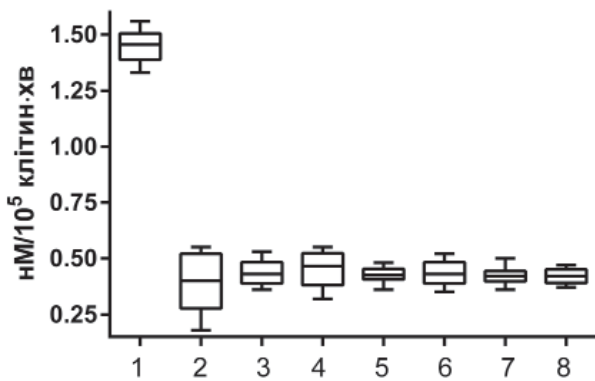
$O_2^{\cdot-}$  дещо переважали пацієнти з ІІ стадією РПК порівняно з хворими з ІІІ стадією (відповідно 11 (69%) проти 5 (31%) осіб;  $p > 0,05$ ). У підгрупі з підвищенням дослідженого показника розподіл пацієнтів за стадією захворювання був практично рівномірним (відповідно 23 (55%) проти 19 (45%) осіб). Медіана швидкості генерування  $O_2^{\cdot-}$  у хворих на РПК до початку лікування становила  $0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв; показник менше медіани був у 30 осіб, більше — у 28. Розподіл пацієнтів відносно медіани у групах лікування був практично однаковим: генерування  $O_2^{\cdot-}$  більше медіани — у 19 (54%), менше медіани — у 16 (46%) хворих І групи, тоді як ІІ групи — у 12 (52%) та 11 (48%) пацієнтів відповідно. Після 1-го сеансу НПТ у хворих ІІ групи, які отримували тегафур під час опромінення, реєстрували зниження рівня швидкості генерування  $O_2^{\cdot-}$  у межах від  $0,09$  до  $0,20$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв (у середньому  $0,14 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв) порівняно з І групою (НПТ без радіомодифікації) — від  $0,16$  до  $0,23$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв ( $0,18 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв;  $p < 0,05$ ). Після 20-го сеансу НПТ активність НАДФ·Н-оксидази у хворих практично не відрізнялася від значень донорів в обох групах (І група —  $0,22 \pm 0,04$ , ІІ група —  $0,20 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв). Перед операцією цей показник знову достовірно підвищувався в обох групах, але різною мірою. У І групі він становив  $0,37 \pm 0,02$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв, у ІІ групі —  $0,28 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв, при цьому різниця між групами була достовірною ( $p < 0,05$ ). Таким чином, вплив НПТ проявився у транзиторному зниженні  $O_2^{\cdot-}$ -генеруючої активності нейтрофілів в обох групах хворих. В учасників І групи, які пройшли лише курс НПТ, рівень  $O_2^{\cdot-}$  на момент операції знову зростав, перевищивши медіану показника ( $> 0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв). Водночас у хворих, які на фоні НПТ отримували тегафур, активність генерування  $O_2^{\cdot-}$  хоч і зросла, але не досягла медіани ( $< 0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв).



**Рис. 1.**  $O_2^{\cdot-}$ -генеруюча активність нейтрофілів у крові хворих на РПК: 1 — донори; 2 — хворі до лікування; 3 та 4 — хворі І та ІІ груп відповідно через добу після початку НПТ; 5 та 6 — хворі І та ІІ груп відповідно після 20 сеансів НПТ; 7 та 8 — хворі І та ІІ груп відповідно через 4–5 тиж після закінчення курсу НПТ (перед операцією)

При пухлинному процесі активація нейтрофілів реалізується за умов утворення функціональної НАДФ·Н-оксидази шляхом взаємодії цитозольних компонентів (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> та Rac 2) із мембранним флавоцитохромом b558 (gp91<sup>phox</sup> та p22<sup>phox</sup>) [1], що може бути мішенню для регулювання активності нейтрофілів.

iNOS, як і НАДФ·Н-оксидаза, забезпечує регуляторну та цитотоксичну активність нейтрофілів, генеруючи NO, який при злоскісній трансформації проявляє як про-, так і протипухлинну активність. При дослідженні активності iNOS у хворих на РПК на етапі встановлення діагнозу загалом виявлено нижчі її рівні ( $0,39 \pm 0,017$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв) порівняно з показниками донорів ( $1,45 \pm 0,02$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв;  $p < 0,01$ ). Медіана активності iNOS у хворих на РПК становила  $0,41$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв. Показник менше медіани мав 31 пацієнт, більше медіани — 27. Після 1-го сеансу НПТ активність iNOS у I та II групах сягала  $0,43 \pm 0,01$  та  $0,46 \pm 0,03$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв відповідно, після 20-го сеансу —  $0,42 \pm 0,05$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв у I групі та  $0,43 \pm 0,02$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв — у II групі ( $p > 0,05$  при порівнянні груп в обидва терміни дослідження); перед операцією цей показник становив у середньому  $0,42 \pm 0,03$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв у хворих обох груп. Це свідчить про те, що НПТ без та із застосуванням тегафуру не впливає на процеси генерування NO нейтрофілами (рис. 2).



**Рис. 2.** Швидкість генерування NO нейтрофілами у крові хворих на РПК: 1 — донори; 2 — хворі до лікування; 3 та 4 — хворі I та II груп відповідно через добу після початку НПТ; 5 та 6 — хворі I та II груп відповідно після 20 сеансів НПТ; 7 та 8 — хворі I та II груп відповідно через 4–5 тиж після закінчення курсу НПТ (перед операцією)

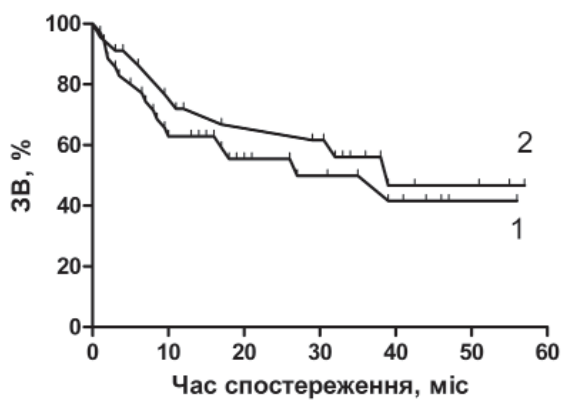
Швидкість генерування O<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO у хворих на РПК має кореляційний зв'язок зі стадією пухлинного процесу ( $r = 0,76$  і  $r = 0,69$  відповідно) та розміром пухлини ( $r = 0,54$  і  $r = 0,67$ ); не залежить від віку пацієнтів ( $r = 0,08$  і  $r = 0,14$ ), статі ( $r = 0,21$  і  $r = 0,17$ ), ступеня диференціювання клітин пухлини ( $r = 0,24$  і  $r = 0,16$ ).

Низькі рівні NO-генеруючої активності нейтрофілів в обох групах пацієнтів із РПК можуть бути пояснені безпосереднім O<sub>2</sub><sup>-</sup>- та NO-залежним порушенням функціональної активності гему ферменту.

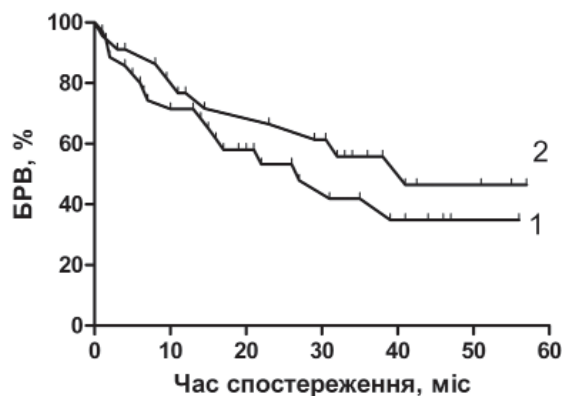
NO може взаємодіяти з гемовим залізом цитохрому P450 з утворенням комплексу NO-цитохром P450, а також, дифундуючи в еритроцити, реагувати із гемовим залізом оксигемоглобіну (HbO<sub>2</sub>) та утворювати комплекси NO-гемоглобін (NOHb) [1, 2]. NO, взаємодіючи з негемовим залізом FeS-білків дихального ланцюга мітохондрій, призводить до порушення механізму транспорту електронів, внаслідок чого ініціюється процес генерування супероксидних радикалів і формується клітинна гіпоксія. За умов неукомплектованості індукбельної NO-синтази кофактором біоптерином ВН<sub>4</sub> фермент проявляє НАДФ·Н-оксидазну активність і генерує супероксидні радикали замість NO. Оксид азоту може взаємодіяти з супероксидними радикалами з утворенням сильного окисника — пероксинітриду (ONOO<sup>-</sup>). Крім того, у попередніх наших дослідженнях [11] було показано, що NO може зв'язуватися з церулоплазміном. Враховуючи вищезазначені механізми зниження рівнів NO, генерованих нейтрофілами, і, як наслідок, зменшення його протипухлинної активності у хворих на РПК, важливо застосовувати терапевтичні впливи з метою корекції рівнів оксиду азоту.

Першим етапом аналізу впливу досліджених показників на загальну та безрецидивну виживаність (ЗВ, БРВ) хворих було визначення останніх у I і II групах у цілому (без розподілу пацієнтів за рівнем генерування O<sub>2</sub><sup>-</sup> і NO). У I групі 5-річна ЗВ становила 42%, медіана виживаності (МВ) — 36 міс; у групі II — 43% та 41 міс відповідно (відношення ризиків (ВР) 1,34; 95% довірчий інтервал (ДІ) 0,62–2,90;  $\chi^2 = 0,536$ ;  $p = 0,464$ ). 5-річна БРВ сягала 38 і 43%, МВ — 30 і 39 міс відповідно (ВР 1,47; 95% ДІ 0,69–3,12;  $\chi^2 = 0,991$ ;  $p = 0,319$ ) (рис. 3). Тобто дещо кращою була виживаність у II групі, але різниця статистично виражена на рівні тенденції.

Аналізували також 5-річну ЗВ та БРВ хворих залежно від рівня активності НАДФ·Н-оксидази до лікування. У пацієнтів ( $n=28$ ), в яких до лікування активність НАДФ·Н-оксидази була більше медіани ( $> 0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв), 5-річна ЗВ становила 40% із МВ 39 міс (ВР 2,85; 95% ДІ 1,06–7,11), БРВ — 30% і 23 міс відповідно (ВР 2,25; 95% ДІ 1,03–4,81). У хворих ( $n=30$ ) з низькою швидкістю генерування O<sub>2</sub><sup>-</sup> (менше медіани) ЗВ сягала 78%, МВ не досягнуто (ВР 0,35; 95% ДІ 0,14–0,95;  $\chi^2 = 4,25$ ;  $p=0,039$ ), БРВ становила 65%, МВ не досягнуто (ВР 0,45; 95% ДІ 0,21–0,97;  $\chi^2 = 4,10$ ;  $p = 0,043$ ; рис. 4). Таким чином, виживаність хворих із низькою швидкістю генерування O<sub>2</sub><sup>-</sup> була достовірно вищою порівняно з пацієнтами з високим показником активності НАДФ·Н-оксидази (при оцінці загальної групи хворих, без урахування групи лікування). Аналіз ЗВ і БРВ окремо у I і II групах підтвердив встановлену та описану вище залежність виживаності від швидкості генерування O<sub>2</sub><sup>-</sup>, але при всіх варіантах порівняння різниця була на рівні тенденції. При зіставленні ЗВ: генерування O<sub>2</sub><sup>-</sup> більше медіани, I група



а

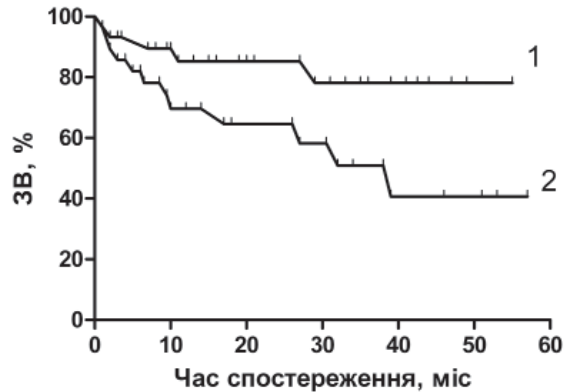


б

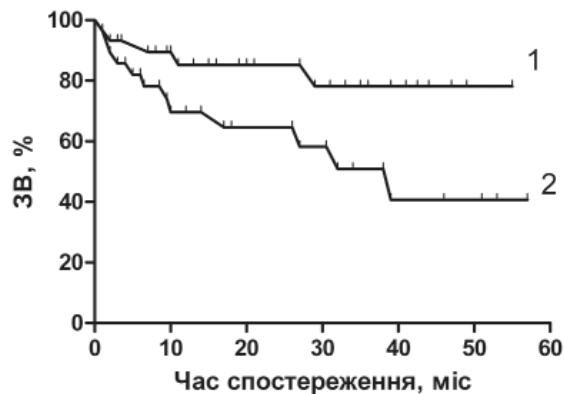
**Рис. 3.** ЗВ (а) та БРВ (б) хворих на РПК I (1) та II (2) груп (без розподілу пацієнтів за рівнем генерування  $O_2^-$ ). Оцінка виживаності за Капланом — Мейером, log-rank тест, при порівнянні ЗВ  $p = 0,464$ , БРВ —  $p = 0,319$

проти II групи —  $p = 0,62$ ; генерування  $O_2^-$  менше медіани, I група проти II групи —  $p = 0,43$ ; I група,  $O_2^-$  більше медіани проти  $O_2^-$  менше медіани —  $p = 0,28$ ; II група,  $O_2^-$  більше медіани проти  $O_2^-$  менше медіани —  $p = 0,43$ . При порівнянні БРВ: генерування  $O_2^-$  більше медіани, I група проти II групи —  $p = 0,60$ ; генерування  $O_2^-$  менше медіани, I група проти II групи —  $p = 0,40$ ; I група,  $O_2^-$  більше медіани проти  $O_2^-$  менше медіани —  $p = 0,23$ ; II група,  $O_2^-$  більше медіани проти  $O_2^-$  менше медіани —  $p = 0,47$ . Отже, встановлено достовірний вплив швидкості генерування  $O_2^-$  НАДФ-Н-оксидазою до початку лікування на ЗВ та БРВ пацієнтів із РПК.

При аналізі 5-річної ЗВ і БРВ хворих на РПК залежно від ступеня зниження NO на етапі встановлення діагнозу виявлено, що у пацієнтів ( $n=27$ ), які до лікування мали вищу активність iNOS ( $> 0,41$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв), 5-річна ЗВ становила 76%, МВ не досягнуто (ВР 0,46; 95% ДІ 0,18–1,23), БРВ — 65%, МВ не досягнуто (ВР 0,48; 95% ДІ 0,23–1,08). У хворих ( $n=31$ ) із низьким показником ( $< 0,41$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв) ЗВ сягала 48%, МВ — 39 міс (ВР 2,20; 95% ДІ 0,81–5,44;  $\chi^2 = 2,32$ ;  $p = 0,13$ ), БРВ — 35%, МВ — 23 міс (ВР 2,08; 95% ДІ 0,93–4,32;  $\chi^2 = 3,11$ ;  $p = 0,078$ ). Тобто виявлено залежність ЗВ і БРВ хво-



а



б

**Рис. 4.** ЗВ (а) та БРВ (б) хворих на РПК II–III стадії залежно від  $O_2^-$ -генеруючої активності нейтрофілів до лікування: менше медіани ( $< 0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв) — 1, більше медіани — 2. Оцінка виживаності за Капланом — Мейером, log-rank тест, при порівнянні ЗВ  $p = 0,039$ , БРВ —  $p = 0,043$

рих на РПК від швидкості генерування NO до початку лікування на рівні тенденції. Для оцінки прогностичного значення цього показника потрібні подальші дослідження зі збільшенням когорти учасників.

## ВИСНОВКИ

1. Розвиток РПК викликає достовірне підвищення  $O_2^-$ -генеруючої активності та зниження активності iNOS нейтрофілів периферичної крові пацієнтів із пухлинним процесом II–III стадії.

2. Застосування НПТ і НПТ з одночасним введенням радіомодифікатора викликало транзиторне зниження швидкості генерування  $O_2^-$ ; водночас вплив НПТ із хіміорадіомодифікацією препаратом тегафур був більш тривалим і вираженим. Не виявлено достовірного впливу застосованих режимів передопераційного лікування на процеси генерування NO нейтрофілами.

3. ЗВ і БРВ пацієнтів, у яких до початку лікування активність НАДФ-Н-оксидази була менше медіани показника у хворих на РПК II–III стадії ( $< 0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв), виявилися статистично достовірно кращими, ніж у пацієнтів із вищою активністю генерування  $O_2^-$  ( $> 0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв) при обох схемах передопераційного лікування.

4. Одержані дані вказують на можливу перспективність визначення  $O_2^{\cdot-}$ -генеруючої активності нейтрофілів периферичної крові хворих на РПК як додаткового прогностичного чинника.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Редоксзависимые молекулы в механизмах опухолевого процесса. К: Наукова думка, 2014. 255 с.
2. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. К: Наукова думка, 2006. 227 с.
3. Jablonska E, Pużewska W, Marcińczyk M, et al. iNOS expression and NO production by neutrophils in cancer patients. Arch Immunol Ther Exp 2005; 53: 175–9.
4. Jablonski J, Jablonska E, Leonik A. The effect of N-nitrosodimethylamine on Bax and Mcl-1 expression in human neutrophils. Bull Environ Contam Toxicol 2011; 87: 638–42.
5. Granot Z, Henke E, Comen E, et al. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. Cancer Cell 2011; 20: 300–14.
6. Jahani-Asl A, Bonni A. iNOS: a potential therapeutic target for malignant glioma. Curr Mol Med 2013; 8: 1241–9.
7. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, et al. Nitric oxide and cancer: a review. World J Surg Oncol 2013; 11: 118–27.
8. Ковальчук ЛВ, Игнатъева ГА, Ганковская ЛВ. Иммунология. Практикум: Учеб. пособ. М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 194 с.
9. 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: 49–53.
10. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Amer Stat Ass 1958; 53: 457–81.
11. Бурлака АП, Ганусевич ІІ, Голотюк ВВ та ін. Порушення у системі церулоплазмін-трансферин у хворих на рак прямої кишки. Онкологія 2014; 16: 206–10.

### INFLUENCE OF NEUTROPHILS $O_2^{\cdot-}$ AND NO-GENERATING ACTIVITY ON THE EFFECTIVENESS OF NEOADJUVANT RADIOTHERAPY IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER

A.P. Burlaka, V.V. Golotiuk, A.V. Vovk, S.M. Lukin, E.P. Sydoryk

**Summary.** *Aim:* to explore the features of superoxide radicals ( $O_2^{\cdot-}$ ) and nitric oxide (NO) generation by neutrophils of blood of patients with rectal cancer (RC) and the correlation between these parameters and sur-

vival rates. **Object and methods:** neutrophils isolated from the blood of 58 patients with RC at stage II–III and those of 20 healthy donors were investigated. The determination of  $O_2^{\cdot-}$ - and NO-generating activity of neutrophils was performed by electron paramagnetic resonance method using the spin trap technology. **Results:** in the vast majority of cancer patients high levels of  $O_2^{\cdot-}$ -generating activity of neutrophils were revealed. During the neoadjuvant radiotherapy (NRT) and NRT with simultaneous injection of a radiomodifier a transient decrease of  $O_2^{\cdot-}$ -generating activity of neutrophils was observed in both groups of patients. In the group I of patients who received only NRT course, before the surgery  $O_2^{\cdot-}$ -level increased again, exceeding the median of the index ( $> 0.31 \text{ nM}/10^5 \text{ cell}\cdot\text{min}$ ). Although in patients who were receiving tegafur on the background of NRT (group II)  $O_2^{\cdot-}$ -generation activity increased, but it had not reached the median ( $< 0.31 \text{ nM}/10^5 \text{ cell}\cdot\text{min}$ ). A significant decrease in NO-generating activity of neutrophils was registering at all stages of the study (before treatment, during the NRT, before surgery). The overall survival and relapse-free survival of patients, whose level of activity of NADPH-oxidase before the treatment was less than the median ( $< 0.31 \text{ nM}/10^5 \text{ cells}\cdot\text{min}$ ), statistically were significantly better than in patients with higher activity of  $O_2^{\cdot-}$ -generation ( $> 0.31 \text{ nM}/10^5 \text{ cells}\cdot\text{min}$ ) for both pre-surgery schemes. **Conclusion:** monitoring of superoxide-generating activity of neutrophils in patients with RC may be an additional indicator for the prediction of treatment effectiveness.

**Key Words:** rectal cancer, neutrophils, NADPH-oxidase, inducible NO-synthase, neoadjuvant radiotherapy, tegafur.

Адреса для листування:

Бурлака А.П.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

Одержано: 25.02.2015