

А.П. Бурлака¹
В.В. Голотюк²
А.В. Вовк¹
С.М. Лукін¹
Є.П. Сидорик¹

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

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

Ключові слова: рак прямої кишки, тромбоцити, НАДФ • Н-оксидаза, індукційна NO-синтаза, рівень фібриногену, загальна виживаність.

РЕДОКС-СТАН ТРОМБОЦИТІВ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛІКУВАННЯ

Тромбоцити відіграють важливу роль у процесах, пов'язаних із ростом пухлини, метастазуванням, неоангіогенезом, пухлиноасоційованим тромбозом. Стимуляція тромбоцитів ініціює генерування супероксидних радикалів та оксиду азоту (NO), що, в свою чергу, сприяє прогресуванню злоякісних пухлин, у тому числі раку прямої кишки (РПК). **Мета:** дослідити редокс-стан тромбоцитів на різних етапах лікування хворих на РПК і зв'язок між активністю тромбоцитів і загальною виживаністю пацієнтів. **Об'єкт і методи:** досліджено тромбоцити 48 хворих на РПК (T2–4N0–2M0G2) та 15 донорів (контроль). Визначення супероксид- та NO-генеруючої активності тромбоцитів проводили методом електронного парамагнітного резонансу з використанням технології спінових уловлювачів. Виживаність аналізували за методом Каплана — Мейєра, використовуючи χ^2 та log-rank критерії. **Результати:** у хворих на РПК виявлено високу активність НАДФ • Н-оксидази тромбоцитів, яка у 8–14 разів перевищує контрольні значення, і водночас низьку активність індукційної NO-синтази (iNOS), яка у 2,6–5,6 разів нижча за показники у донорів. Після неoad'ювантної променевої терапії та видалення пухлини зареєстровано зниження активності НАДФ • Н-оксидази та підвищення iNOS, однак фізіологічних меж вони не досягли. 5-річна загальна виживаність хворих, у яких через 1 міс після операції встановлено найбільше зниження активності НАДФ • Н-оксидази ($< 1,5 \text{ нМ}/10^5$ клітин·хв, що нижче за медіану показника на цей термін обстеження), була достовірно ($p < 0,004$) кращою, ніж пацієнтів із більш високими рівнями генерації супероксидних радикалів. **Висновок:** визначення динаміки активності НАДФ • Н-оксидази на етапах лікування хворих на РПК (особливо ступеня зниження після операції) може бути додатковим критерієм прогнозу ефективності лікування.

ВСТУП

Тромбоцити розглядають як важливі посередники розвитку пухлини, ангіогенезу, формування гіперкоагульованого стану та метастазування. Серйозною проблемою при лікуванні хворих на рак є також венозна тромбоемболія [1]. Ліганд CD40 (CD40L), який вивільняється тромбоцитами після стимуляції, опосередковано бере участь в ініціації запальної відповіді в стінці судин шляхом індукції генерування супероксидних радикалів нейтрофілами та тромбоцитами [2]. Активація тромбоцитів, разом зі зв'язуванням з ендотелієм та утворенням тромбу, є жорстко регульованою. Крім добре відомих регуляторних факторів тромбоцитів (оксид азоту (NO), аденозин), участь в активації тромбоцитів беруть також супероксидні радикали, що проявляється вивільненням ростових факторів, цитокінів та активацією НАДФ • Н-оксидази та NO-синтази [3]. Супероксидні радикали, при зростанні їхніх рівнів, реагують з NO, джерелом якого також є тромбоцити чи ендотелій, з утворенням пероксинітриду ONOO⁻ [4, 5]. Регулювання активності

тромбоцитів необхідне для профілактики тромботворення, запобігання ініціації неоангіогенезу та запалення. Тому оцінка рівнів супероксид- та NO-генеруючої активності тромбоцитів у пацієнтів онкологічного профілю на різних етапах лікувального процесу є актуальною.

Мета роботи — дослідити редокс-стан тромбоцитів у хворих на рак прямої кишки (РПК) при комбінованому лікуванні та вплив їхньої активності на загальну виживаність (ЗВ) пацієнтів.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено тромбоцити 48 хворих (20 чоловіків і 28 жінок, середній вік — $62,0 \pm 1,8$ року) з діагнозом аденокарциноми прямої кишки II–III стадії (T2–4N0–2M0G2), які перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. У всіх пацієнтів діагноз, стадію захворювання та наявність метастазів верифіковано відповідно до вимог доказової медицини (у ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно). Лікування хворих

на РПК проводили в 2 етапи: неоад'ювантна променева терапія (НПТ) — 20 сеансів дистанційного гамма-опромінення на ділянку пухлини фракціями по 2 Гр до сумарної вогнищевої дози 40 Гр; радикальне оперативне втручання через 4–6 тиж.

Критеріями виключення хворих при проведенні дослідження були: вік > 80 років; первинно-множинний характер пухлинного ураження; загальний тяжкий стан хворих при встановленні діагнозу, зумовлений наявністю супутніх соматичних захворювань у стадії декомпенсації; прийом вітамінів-антиоксидантів хворими за 1 міс до початку і під час проведення досліджень. Учасники були ознайомлені зі структурою дослідження, з цілями та завданнями, а також проінформовані про проведення необхідних діагностичних процедур і дали згоду на використання крові з дослідницькою метою. Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень за участю людей, викладених у Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації.

Як антикоагулянт використовували розчин трилону Б (3%). У пробірку з 1 мл трилону Б набирали 5 мл крові з ліктьової вени, кров відстоювали впродовж 40 хв. Тромбоцити виділяли відповідно до методики, описаної в роботі [6]. 250 мкл очищеної фракції тромбоцитів використовували для визначення рівнів швидкості генерування O_2^- та NO. Дослідження супероксид-генеруючої активності НАДФ•Н-оксидази тромбоцитів проводили методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) з використанням спінових уловлювачів — 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину при кімнатній температурі. Швидкість генерування оксиду азоту індукбельною NO-синтазою (iNOS) визначали методом електронного парамагнітного резонансу та технології Spin Traps за температури 77 °К. Як спіновий уловлювач застосовували діетилдитіокарбамат («Sigma») [7]. Дослідження рівня фібриногену в плазмі крові проводили згідно зі стандартною методикою за Клаусом [8].

Супероксид-генеруючу активність НАДФ•Н-оксидази і швидкість генерування оксиду азоту iNOS визначали на етапі встановлення діагнозу (до початку лікування), після 1 та 20 сеансів НПТ, перед операцією (через 4–5 тиж після закінчення НПТ), через 2 тиж та 1 міс після операції. Вміст фібриногену в плазмі крові визначали до початку лікування і після курсу НПТ. Контролем слугували встановлені за аналогічними методиками показники 15 практично здорових людей (7 чоловіків і 8 жінок віком 50–58 років).

Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера, міжгрупові відмінності оцінювали за допомогою критеріїв χ^2 та log-rank тесту [9]. Статистичний аналіз проводили з використанням прикладних ліцензійних програм SPSS 17.0 та Origin 7.0. Різницю між результатами вважали достовірною при $p < 0,05$.

НАДФ•Н-оксидаза функціонує у мембранах тромбоцитів; при активації останніх експресується каталітична субодиниця ферменту gp91^{phox}, яка в подальшому регулює генерування супероксидних радикалів. Іншими складовими НАДФ•Н-оксидази є p47^{phox}, p67^{phox} і Rac [10, 11]. На рис. 1 наведено дані щодо швидкості генерування супероксидних радикалів НАДФ•Н-оксидазою тромбоцитів. У практично здорових людей цей показник становить $0,250 \pm 0,001$ нМ/10⁵ клітин·хв, у той час як у хворих на РПК до лікування — $2,67 \pm 0,08$ (1,75–3,95) нМ/10⁵ клітин·хв. Тобто супероксид-генеруюча активність тромбоцитів у хворих на РПК у 8–14 ($p < 0,001$) разів перевищує такий показник у донорів. Умовно за цим критерієм пацієнтів можливо поділити на 3 групи: з високою активністю ($n = 10$) — $> 3,20$ ($> 3,45 \pm 0,11$) нМ/10⁵ клітин·хв; з помірною активністю ($n = 18$) — $2,50$ – $3,2$ ($2,75 \pm 0,03$) нМ/10⁵ клітин·хв ($p < 0,05$); з низькою активністю ($n = 20$) — $< 2,5$ ($< 2,35 \pm 0,05$) нМ/10⁵ клітин·хв ($p < 0,05$).

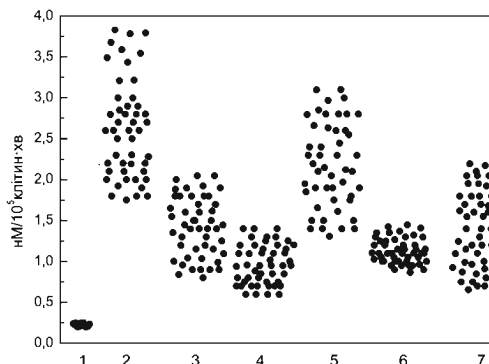


Рис. 1. Вплив НПТ та операції у хворих на РПК на супероксид-генеруючу активність НАДФ•Н-оксидази тромбоцитів: 1 — донори (контроль); 2 — хворі на РПК до початку лікування; 3 — після 1-го сеансу НПТ; 4 — після 20 сеансів НПТ; 5 — перед операцією (4–5 тиж після курсу НПТ); 6 — через 2 тиж після операції; 7 — через 1 міс після операції

Уже після першого сеансу НПТ реєструють зниження швидкості генерування супероксидних радикалів тромбоцитами хворих (до рівня $< 2,5$ нМ/10⁵ клітин·хв). Після 20-го сеансу цей показник знижується до $0,94 \pm 0,04$ (від 0,75 до 1,30) нМ/10⁵ клітин·хв, тобто до значень, які в 3,0–5,2 раза перевищують показники у донорів ($p < 0,05$ порівняно як з донорами, так і з хворими на РПК до лікування). Перед операцією (через 4–5 тиж після закінчення НПТ) активність НАДФ•Н-оксидази визначали в межах 1,31–3,10 ($2,19 \pm 0,08$) нМ/10⁵ клітин·хв ($p < 0,05$). При цьому гетерогенність показника знову підвищилася: у частини хворих ($n = 12$; 25%) відмічена його стабілізація, в той час як у інших ($n = 36$; 75%) швидкість генерування супероксидних радикалів зростає. Через 2 тиж після операції досліджуваній показник становив $1,10 \pm 0,03$ нМ/10⁵ клітин·хв

($p < 0,05$ порівняно з середнім результатом до операції), через 1 міс після проведеного лікування — $1,34 \pm 0,07$ нМ/10⁵ клітин·хв ($p < 0,05$ порівняно з середнім результатом через 2 тиж). На цей час пацієнтів за динамікою активності тромбоцитів можливо розділити на 2 групи, а саме: 27 хворих, у яких зниження швидкості генерування супероксидних радикалів нижче медіани було стабільним ($1,02 \pm 0,06$ нМ/10⁵ клітин·хв), та 21 пацієнт, у яких знову спостерігали достовірне зростання цього показника ($1,85 \pm 0,04$ нМ/10⁵ клітин·хв; $p < 0,05$). Варто зазначити, що до першої групи увійшли переважно пацієнти з низькою ($n = 16$) та помірною ($n = 10$) супероксид-генеруючою активністю тромбоцитів до лікування; у другій групі переважали пацієнти, які до лікування мали помірну ($n = 8$) та високу ($n = 9$) активність НАДФ • Н-оксидази. Сукупність одержаних результатів показує, що НПТ та видалення пухлини знижує супероксид-генеруючу активність тромбоцитів, однак досягти показників, наближених до контрольних значень, не вдається.

Рівень швидкості генерування оксиду азоту iNOS тромбоцитів у практично здорових людей становив $1,45 \pm 0,02$ нМ/10⁵ клітин·хв. У хворих на РПК на різних етапах лікування (рис. 2) цей показник фіксували в таких межах: на етапі встановлення діагнозу — $0,25–0,49$ ($0,34 \pm 0,01$) нМ/10⁵ клітин·хв ($p < 0,01$ порівняно з контролем); після 20 сеансів НПТ — $0,31–0,54$ ($0,40 \pm 0,02$) нМ/10⁵ клітин·хв; через 4–5 тиж після курсу НПТ — $0,35–0,65$ ($0,47 \pm 0,01$) нМ/10⁵ клітин·хв ($p < 0,05$ порівняно з середнім результатом до лікування). Курс НПТ та операція спричинили підвищення активності iNOS до значень $0,69 \pm 0,02$ нМ/10⁵ клітин·хв; через 1 міс після лікування зареєстровано рівень $0,42–1,15$ ($0,75 \pm 0,03$) нМ/10⁵ клітин·хв. Тобто спостерігали достовірне ($p < 0,05$) зростання активності iNOS на всіх етапах обстеження, хоча протягом усього дослідження цей показник був суттєво нижчим ($p < 0,05$), ніж у донорів. За розподілом результатів через 1 міс після операції пацієнтів можна розділити на 2 групи: у першій ($n = 31$) значення активності iNOS нижчі за медіану ($0,75$ нМ/10⁵ клітин·хв) та збігаються з показниками, які реєстрували через 2 тиж після операції, — $0,64 \pm 0,02$ нМ/10⁵ клітин·хв; у другій ($n = 17$) — продовжують зростати і перевищують медіану — $1,01 \pm 0,02$ нМ/10⁵ клітин·хв, хоча і не досягають рівня, характерного для донорів ($p < 0,05$).

На рис. 3 наведено результати дослідження рівнів фібриногену. У донорів вміст фібриногену у плазмі крові становив $3,08 \pm 0,14$ (2,97–3,91) г/л. Рівень цього білка у хворих до лікування був у межах $2,97–7,88$ ($5,27 \pm 0,19$) г/л ($p < 0,01$). НПТ супроводжувалася певним зниженням вмісту фібриногену — до $3,01–6,38$ ($4,60 \pm 0,14$) г/л ($p < 0,05$ порівняно як з контролем, так і рівнем до лікування).

Швидкість генерування супероксидних радикалів у хворих на РПК має кореляційний зв'язок зі стадією пухлинного процесу ($r = 0,74$) і розміром

пухлини ($r = 0,65$); рівнем фібриногену ($r = 0,59$) й активністю iNOS ($r = 0,34$); не залежить від віку пацієнтів ($r = 0,05$), ступеня диференціювання клітин пухлини ($r = 0,13$). Між активністю iNOS тромбоцитів і вмістом фібриногену у плазмі крові пацієнтів із РПК до лікування не виявлено кореляційних зв'язків ($r = 0,09$); після НПТ від'ємна кореляція цих показників досягла середнього рівня ($r = -0,49$). Це узгоджується з даними, згідно з якими фібриноген ініціює адгезію тромбоцитів до ендотелію, а NO, що є основним інгібітором функції тромбоцитів, непрямо протидіє їй [5, 16, 17].

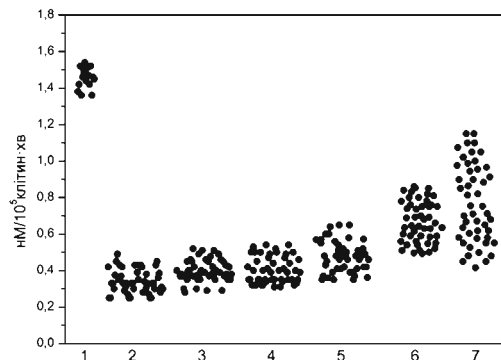


Рис. 2. Вплив НПТ та операції у хворих на РПК на активність iNOS тромбоцитів: 1 — донори (контроль); 2 — хворі на РПК до початку лікування; 3 — після 1-го сеансу НПТ; 4 — після 20 сеансів НПТ; 5 — перед операцією (4–5 тиж після курсу НПТ); 6 — через 2 тиж після операції; 7 — через 1 міс після операції

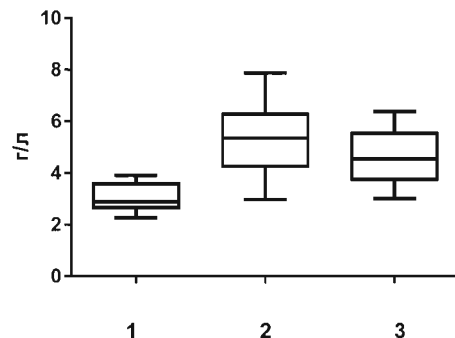


Рис. 3. Вміст фібриногену у плазмі крові донорів (1) та хворих на РПК до лікування (2) і після курсу НПТ (3)

Таким чином, наявність пухлини зумовлює високу активність редоксзалежної НАДФ • Н-оксидази тромбоцитів, зниження активності їхньої iNOS, підвищення рівня фібриногену в плазмі крові. Після проведення НПТ і видалення пухлини відзначають суттєві зміни перелічених показників, спрямовані на повернення до фізіологічної норми, якої у жодному випадку не було досягнуто.

Супероксидним радикалам належить ключова роль у модулюванні сигнальних шляхів компонентів каскаду коагуляції та фібринолізу за рахунок зниження рівнів NO, що посилює сприйнятливості тромбоцитів до факторів росту тромбу, підвищення біоактивності аденозиндифосфату, перетворення протромбіну в тромбін, у результаті чого відбу-

вається залучення додаткової кількості тромбоцитів до цього процесу. Надвисокі нерегульовані рівні генерування тромбоцитами радикалів кисню призводять до порушення специфічних патофізіологічних функцій раніше, ніж формуються відповідні епіфеномени. Формування тромбу залежить від зміни редокс-стану тромбоцитів та ендотелію судин [12, 13]. Низькі рівні NO-генеруючої активності тромбоцитів у хворих на РПК як до лікування, так і на всіх етапах спостереження вірогідно спричиняються тим, що частина NO може перехоплюватися супероксидними радикалами, рівні генерування яких у цих хворих дуже високі, з утворенням пероксинітриду, а також окисно-індукованим пошкодженням ферменту синтезу NO чи його неукмплектованістю біоптерином B_4 , зокрема в ендотеліальних клітинах [4, 14]. Окисно-індукована дисфункція ендотелію відіграє важливу роль не тільки у формуванні тромбозу, а й у неоангіогенезі, ремодельованні судин, внутрішньосудинній активації тромбоцитів і лейкоцитів, ендотеліально-лейкоцитарній взаємодії та міграції моноцитів. При інактивації NO супероксидними радикалами активуються гени, які беруть участь у формуванні прозапального фенотипу, що може сприяти прогресуванню пухлинного росту. Дефіцит NO посилює проліферацію та міграцію гладком'язових клітин судин, інвазію моноцитів у субінтимальний простір з активацією НАДФ•Н-оксидази і, як наслідок, ремодельовання судин та їхню гіпертрофію [15].

Проаналізовано 5-річну ЗВ хворих залежно від рівня активності НАДФ•Н-оксидази, iNOS тромбоцитів і вмісту фібриногену в плазмі крові до лікування, а також через 1 міс після операції. У пацієнтів, які до лікування мали високу активність НАДФ•Н-оксидази ($> 3,20 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$), 5-річна ЗВ становила 39% з медіаною 22 міс, за помірної ($2,5\text{--}3,0 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$) та низької ($< 2,35 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$) супероксид-генеруючої активності — 56 та 62% відповідно (медіани ЗВ у цих підгрупах не досягнуто; $\chi^2 = 0,88$; $p = 0,35$) (рис. 4). Як зазначено вище, через 1 міс після операції за активністю НАДФ•Н-оксидази пацієнтів розділили на 2 групи: з показником, нижчим ($< 1,5 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$) та вищим ($> 1,5 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$) за медіану. Залежність виживаності хворих від рівня супероксид-генеруючої активності тромбоцитів через 1 міс після операції виявилася статистично достовірною: за активності $< 1,5 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$ 5-річна ЗВ становила 68% (медіана виживаності не досягнута), за активності $> 1,5 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$ — 32% (медіана виживаності 15 міс; log-rank тест; $\chi^2 = 8,2$; $p = 0,004$) (рис. 5).

Аналіз 5-річної ЗВ хворих на РПК залежно від швидкості генерування NO продемонстрував, що цей показник був дещо вищим (різниця статистично не достовірною) у підгрупах пацієнтів, які мали рівні активності iNOS, вищі за значення її медіани до лікування та через 1 міс після операції (рис. 6, 7). Водночас у підгрупах з більшою активністю iNOS медіани ЗВ не досягнуто, у підгрупах із меншою активністю iNOS вона

становила 29 міс (див. рис. 6) і 27 міс (див. рис. 7), але ця різниця не мала достатньої статистичної значущості (log-rank тест, $p = 0,4$ і $p = 0,2$ відповідно). Статистично суттєвої різниці 5-річної ЗВ залежно від вмісту фібриногену в плазмі крові хворих на РПК на різних етапах лікування не виявлено.

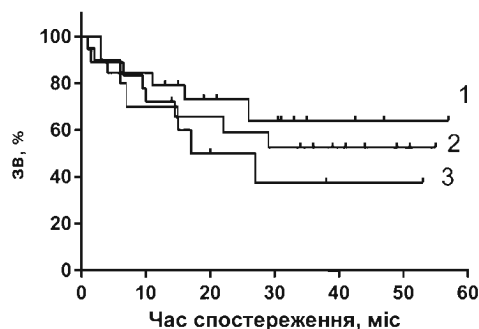


Рис. 4. ЗВ хворих на РПК II–III стадії (T2–4N0–2M0G2) залежно від супероксид-генеруючої активності НАДФ•Н-оксидази тромбоцитів до лікування: 1 — швидкість генерування супероксидних радикалів $< 2,35 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$; 2 — $2,5\text{--}3,0 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$; 3 — $> 3,20 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$. Оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест, $p = 0,35$

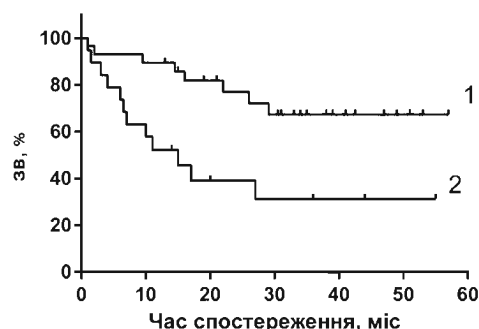


Рис. 5. ЗВ хворих на РПК II–III стадії (T2–4N0–2M0G2) залежно від супероксид-генеруючої активності НАДФ•Н-оксидази тромбоцитів через 1 міс після операції: 1 — швидкість генерування супероксидних радикалів $< 1,5 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$; 2 — $> 1,5 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$. Оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест, $p = 0,004$

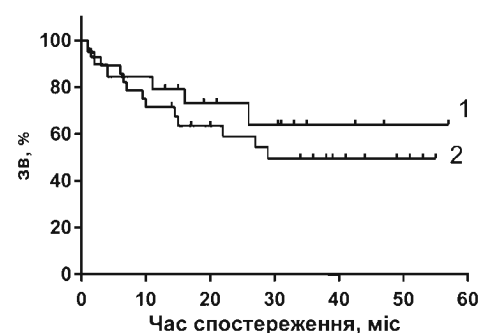


Рис. 6. ЗВ хворих на РПК II–III стадії (T2–4N0–2M0G2) залежно від активності iNOS тромбоцитів до лікування: 1 — швидкість генерування NO $> 0,34 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$; 2 — $\leq 0,34 \text{ нМ}/10^5 \text{ клітин}\cdot\text{хв}$. Оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест, $p = 0,4$

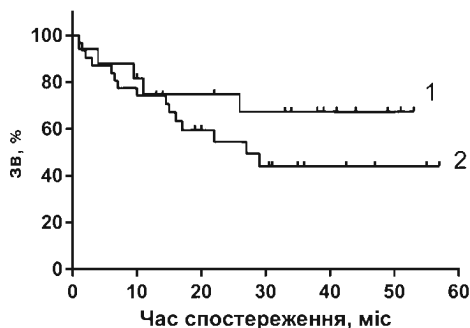


Рис. 7. ЗВ хворих на РПК II–III стадії (T2–4N0–2M0G2) залежно від активності iNOS тромбоцитів через 1 міс після операції: 1 — швидкість генерування NO $> 0,75$ нМ/10⁵ клітин·хв; 2 — $< 0,75$ нМ/10⁵ клітин·хв. Оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест, $p = 0,2$

Таким чином, встановлено достовірний вплив на виживаність хворих на РПК рівня активності НАДФ•Н-оксидази тромбоцитів через 1 міс після операції. Залежність виживаності пацієнтів з таким захворюванням від рівня активності iNOS тромбоцитів і вмісту фібриногену в плазмі крові потребує подальшого вивчення зі збільшенням когорти учасників.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на РПК виявлено значно підвищені рівні активності НАДФ•Н-оксидази та суттєво знижені рівні NO-генеруючої активності тромбоцитів на всіх етапах обстеження. У процесі лікування (після курсу НПТ та особливо після хірургічного видалення пухлини) відзначали достовірне зниження першого показника та зростання другого, однак фізіологічних меж вони не досягли.

2. Виживаність хворих, у яких через 1 міс після операції спостерігали найбільш виражене зниження активності НАДФ•Н-оксидази тромбоцитів, була статистично достовірно кращою, ніж пацієнтів з більш високими значеннями цього показника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Connolly G, Phipps R, Francis Ch. Platelets and cancer-associated thrombosis. *Semin Oncol* 2014; **41**: 302–10.
2. Jenne C. Platelets: crossroads of immunity and hemostasis. *Blood* 2014; **124**: 671–2.
3. Pietraforte D, Vona R, Marchesi A, et al. Redox control of platelet functions in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2014; **21**: 177–93.
4. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. *К: Наукова думка*, 2006. 227 с.
5. Montezano A, Touyz R. Reactive oxygen species and endothelial function — role of nitric oxide synthase uncoupling and nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; **110**: 87–94.
6. Qureshi A, Karpen Ch, Qureshi N, et al. Tocotrienols-induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 58–71.

7. 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.

8. Zhen-Qiang Sun, Xiao-Na Han, Hai-Jiang Wang, et al. Prognostic significance of preoperative fibrinogen in patients with colon cancer. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 8583–91.

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

10. Бурлака АП, Сидорик ЄП, Ганусевич ІІ та ін. Вплив антикоагулянтів на показники окисного стресу та виживаність хворих на рак прямої кишки після радикального лікування. *Український журнал гематології та трансфузіології* 2008; **2**: 38–44.

11. Violi F, Pignatelli P. Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment. *Thromb Haemost* 2014; **111**: 817–23.

12. Li R, Ren M, Chen N, et al. Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* 2014; **14**: 167–77.

13. Sousa CG, Böhmer AE, Müller AP, et al. Effects of highly palatable diet on lipid and glucose parameters, nitric oxide, and ectonucleotidases activity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2010; **35**: 591–7.

14. Kar S, Kavdia M. Modeling of biopterin dependent pathways of eNOS for nitric oxide & superoxide production. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 1411–1427.

15. Garelnabi M, Gupta V, Mallika V, et al. Platelet nitric oxide signaling system in patients with coronary artery disease. *Ann Vasc Dis* 2011; **4**: 99–105.

16. Marwali M, Hu Ch, Mohandas Bh, et al. Modulation of ADP-induced platelet activation by aspirin and pravastatin: role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, nitric oxide, oxidative stress, and inside-out integrin signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **3**: 1324–32.

17. Štikarová Ja, Kotlín R, Riedel T, et al. The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function. *Scientific World J* 2013; **2013**: 1–8.

REDOX STATE OF PLATELETS IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER AND ITS IMPACT ON THE EFFICACY OF TREATMENT

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

Summary. Platelets play an important role in the processes that are associated with tumor growth, metastasis, neoangiogenesis, tumor-associated thrombosis. Stimulation of the platelets initiates the generation of superoxide radicals and nitric oxide NO, which in turn contributes to the progression of malignant tumors, including rectal cancer (RC). **Objective:** to investigate the redox state of platelets at different stages of treatment of patients with RC and the relationship between platelet activity and overall survival of patients (control). **Subjects and methods:** platelets of 48 patients with RC (T2–4N0–2M0G2) and 15 donors (control group) were studied. The investigation of superoxid- and NO-generating activity of platelets was performed by electron paramagnetic resonance technology with spin trap. Survival was analyzed by Kaplan — Meier method using χ^2 and log-rank criteria. **Results:** in patients with RC were revealed high activity of NADP•H-oxidase platelets, which is 8–14 times higher than the ref-

erence value, and at the same time the low activity of inducible NO-synthase (iNOS), which was 2.6–5.6 times lower than the performance of donors. After neoadjuvant radiotherapy and tumor removal were registered decreased activity of NADP⁺H-oxidase and increasing — iNOS, but physiological limits were not reached. 5-year overall survival of patients who at 1 month after surgery it was found the greatest reduction activity of NADP⁺H-oxidase ($< 1.5 \text{ nM}/10^5 \text{ cell-min}$, lower than the median index at this time of investigation) was significantly ($p < 0.004$) better than that in patients with higher levels of generation of superoxide radicals. **Conclusion:** determination of the dynamics of activity of NADP⁺H-oxidase on the stages of treatment of

the RC (especially the degree of reduction after surgery) may be an additional criterion for prediction of treatment effectiveness.

Key Words: rectal cancer, platelets, NADP⁺H-oxidase, inducible NO-synthase, the level of fibrinogen, overall survival.

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: 13.01.2015