

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І  
РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО**

**ГОЛОТЮК ВОЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВИЧ**

УДК 616-071+616-036+615.84+616-006+616.351

**ОПТИМІЗАЦІЯ ОКИСНО-ВІДНОВНОГО СТАТУСУ У  
ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ: МОЛЕКУЛЯРНІ  
МЕХАНІЗМИ ЕФЕКТИВНОСТІ КОМПЛЕКСНОГО  
ЛІКУВАННЯ**

14.01.07 – онкологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора медичних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» МОЗ України.

**Науковий консультант** - академік НАН України, доктор медичних наук, професор  
**Чехун Василь Федорович**,  
завідувач відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії, директор Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України.

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор  
**Фецич Тарас Григорович**,  
завідувач кафедри онкології та радіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України;

доктор медичних наук, професор  
**Мясодов Станіслав Дмитрович**,  
завідувач кафедри онкології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України;

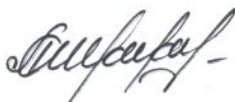
доктор медичних наук  
**Яценко Людмила Дмитрівна**,  
провідний науковий співробітник відділення хіміотерапії солідних пухлин Національного інституту раку МОЗ України.

Захист відбудеться « 01 » листопада 2017 р. о 13 годині 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (03022 м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий « \_\_\_\_ » вересня 2017 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук



Л.М. Шлапацька

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Рак прямої кишки (РПК) відноситься до найбільш поширених злоякісних новоутворень зі стійкою тенденцією до зростання показників захворюваності як в Україні, так і в більшості економічно розвинутих країн світу (Федоренко З.П. та співавт., 2015, 2016; Torre L.A. et al., 2015; Siegel R. et al., 2016; Gomez S.L. et al., 2017). В Україні, згідно даних національного канцер-реєстру, захворюваність і смертність від РПК становлять, відповідно, 20,6 і 12,4 випадків на 100 тис. населення (Федоренко З.П. та співавт., 2015, 2016).

Лікування хворих на РПК є мультидисциплінарною проблемою, основною і найбільш ефективною складовою якої залишається хірургічний метод. Проте, віддалені результати хірургічного лікування РПК після широкого впровадження принципів тотальної мезоректумектомії залишаються без суттєвих змін протягом десятиліть (Lange M.M., 2009; van Gijn W., van de Velde C.J., 2011). За останні роки вдалося достовірно підвищити показники виживаності хворих на РПК завдяки застосуванню променевої терапії (ПТ), яка в схемі комбінованого лікування виявилась більш ефективною на доопераційному етапі лікування хворих. Тому існуючі стандарти лікування хворих на РПК II-III стадій в Україні, європейських країнах і США передбачають призначення неоад'ювантної променевої (НПТ) і хіміо-променевої терапії (НХПТ), а також ад'ювантної хіміотерапії (АХТ) за показами (Бондарь Г.В., 2009; Modrek A.S. et al., 2015; Колеснік О.О. та співавт., 2015; Habr-Gama A. et al., 2015; Bryant A.K. et al., 2017).

На сьогоднішній день призначення НХПТ ґрунтується на таких основних характеристиках РПК як загальний стан хворого, ступінь розповсюдження пухлинного процесу, локалізація та розміри пухлини, гістологічний тип і ступінь диференціювання пухлинних клітин (Garajova I. et al., 2011; Колеснік О.О. та співавт., 2015). Поряд з цим слід відзначити емпіричний характер призначення НПТ і НХПТ через відсутність абсолютних ознак чутливості/резистентності пухлин до ПТ і цитостатиків, а вибір тієї чи іншої схеми лікування все ще базується на даних доклінічних випробувань та особистому досвіді лікаря (Проценко С.А., 2007; Imyanitov E.N. et al., 2007; Garajová I. et al., 2011; Habr-Gama A. et al., 2015).

Наведене свідчить про нагальну необхідність та актуальність розробки індивідуальних схем хіміо-променевого лікування хворих на підставі прогнозу клінічного перебігу РПК, який повинен враховувати комплекс факторів, у тому числі молекулярно-біологічних. У цьому аспекті все більшої значимості набувають дослідження останніх років щодо з'ясування молекулярних механізмів злоякісного росту за участі редокс-факторів – супероксидних радикалів кисню (СР) і оксиду азоту (NO), що визначають окисно-відновний потенціал пухлинних клітин. Важливість такого напрямку досліджень РПК ґрунтується на тому, що СР і NO задіяні у модуляції багатьох процесів: міжклітинних взаємодіях, неоангіогенезі, сигнальних каскадах, змінах міжклітинного матриксу (De Ridder M. et al., 2008; Choudhari S.K. et al., 2013; Cheng H. et al., 2014; Бурлака А.П., Сидорик Є.П. 2014; Bonavida B., 2015).

На даний час також важливим є вивчення ролі молекулярно-біологічних

маркерів апоптозу Вах, клітинної проліферації Ki-67, ангиогенезу Анг-2, індукбельної синтази оксиду азоту (iNOS) та окисних форм гуаніну в патогенезі РПК, проте дані літератури щодо їх діагностичного та прогностичного значення є неоднозначними і часто суперечливими (X. Liu et al., 2012; Roszkowski K., Olinski R., 2012; Rahat M.A., Hemmerlein B., 2013).

Подальші комплексні дослідження особливостей молекулярних механізмів, які визначають індивідуальну радіо- та хіміочутливість РПК, сприятимуть розробці нових ефективних і максимально толерантних для нормальних тканин схем проведення та способів потенціювання променевого лікування і хіміотерапії. Їх впровадження дасть можливість оптимізувати лікування хворих на РПК шляхом його персоналізації, на що спрямована увага онкологів усього світу (Walther Z., Sklar J., 2011; Иванкова В.С., Дёмина Э.А., 2012; Чехун В.Ф., 2012; Grimm E.A. et al., 2013; Некласова Н.Ю. и соавт., 2014; Habr-Gama A. et al., 2015). Зокрема, дослідження останніх років дають теоретичне і експериментальне обґрунтування доцільності застосування NO з метою хіміо- та радіосенсибілізації злоякісних пухлин, у тому числі РПК (De Ridder M. et al., 2008; Singh S. et al., 2011; Donia M. et al., 2011; Mojić M. et al., 2012).

Таким чином, поруч із загальновизнаними прогностичними та вже відомими предиктивними факторами, надзвичайно важливим та актуальним є пошук молекулярно-біологічних маркерів для оцінки прогнозу клінічного перебігу РПК, які слугуватимуть підґрунтям для розробки нових терапевтичних підходів та персоналізації лікування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана на кафедрі онкології ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» МОЗ України у відповідності до плану науково-дослідних робіт за темами: «Вивчення ефективності неoad'ювантної поліхіміотерапії та променевої терапії в комплексному лікуванні раку органів травлення, дихання, репродуктивної системи» (2012-2014 рр., номер державної реєстрації 0112U005125) та «Значення клінічних, морфологічних та молекулярно-біологічних маркерів в діагностиці, прогнозуванні особливостей перебігу та результатів лікування раку органів репродуктивної системи та шлунково-кишкового тракту» (2015-2017 рр., номер державної реєстрації 0114U005548).

**Мета дослідження.** Підвищити ефективність протипухлинної терапії хворих на рак прямої кишки шляхом індивідуалізації лікувальної тактики з урахуванням окисно-відновного статусу пацієнтів та молекулярного профілю пухлин.

#### **Задачі дослідження.**

1. Оцінити клініко-морфологічні особливості пухлинного процесу та ступінь лікувального патоморфозу РПК в залежності від застосованої схеми неoad'ювантного лікування хворих, зокрема променевої терапії (НПТ), хіміо-променевої терапії (НХПТ) та НХПТ на фоні радіомодифікації.

2. Визначити показники окисно-відновного статусу в пухлині і периферичній крові хворих на РПК до і після проведення НПТ/НХПТ, та їх зв'язок з клініко-морфологічними характеристиками пухлинного росту і прогнозом захворювання.

3. З'ясувати особливості молекулярного профілю пухлин: рівень експресії маркерів апоптозу Вах, клітинної проліферації Ki-67, ангиогенезу Анг-2 та iNOS у хворих на РПК, їх зв'язок з редокс-параметрами пухлини, клініко-морфологічними особливостями пухлин і прогнозом захворювання.

4. Оцінити динаміку показників окисних модифікацій ДНК, білків і ліпідів в процесі неoad'ювантного лікування хворих на РПК та з'ясувати їх інформативність в якості предиктивних маркерів ефективності ХПТ.

5. Розробити та застосувати метод радіомодифікації при НХПТ у хворих на РПК з урахуванням показників редокс-статусу пухлини.

6. Застосувати препарат L-аргініну гідрохлорид для радіомодифікації НХПТ хворих на РПК, оцінити його ефективність і безпечність та розробити показання до його призначення залежно від індивідуальних молекулярно-біологічних особливостей пухлин.

7. Визначити комплекс клінічно-значимих предиктивних факторів окисно-відновного статусу пацієнтів та молекулярного профілю пухлини для оптимізації і персоналізації тактики лікування хворих на РПК.

*Об'єкт дослідження:* рак прямої кишки I-III стадій.

*Предмет дослідження:* CP- та NO-генеруюча активність пухлин та клітин периферичної крові хворих на РПК та їх зв'язок з клінічними, морфологічними і молекулярно-біологічними характеристиками РПК (стадія, патогістологічні параметри пухлин, рівень маркерів окисних модифікацій ДНК, ліпідів і білків; рівень експресії молекулярно-біологічних маркерів Ki-67, iNOS, Вах, Анг-2); перебігом захворювання, безпосередніми та віддаленими результатами лікування хворих на РПК, у тому числі із застосуванням нової методики радіомодифікації, та можливість використання цих показників в якості предиктивних і прогностичних маркерів.

**Методи дослідження:** загальноклінічні, клініко-інструментальні та променеві – для визначення стану внутрішніх органів та супутніх захворювань, ступеня поширення пухлинного процесу та ефективності лікування; біохімічні – для визначення показників окисної модифікації ліпідів, білків, ДНК; метод спектроскопії електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) із застосуванням технології спінових уловлювачів SpinTraps – для прямого визначення рівня генерування клітинами крові та в пухлині CP та NO; морфологічні (гістологічний, морфометричний, гістохімічний) – для визначення гістологічного варіанту пухлини та оцінки променевого патоморфозу; імуофлуоресцентний – для визначення експресії Ki-67, Анг-2, iNOS та Вах в пухлині; клініко-статистичні – для розрахунку показників виживаності хворих; статистичні методи обробки отриманих кількісних даних із визначенням рівня достовірності отриманих результатів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше в Україні науково обґрунтовано і доведено значення редокс-факторів – CP і NO, як біологічних показників злякисного росту, їх зв'язок з молекулярно-біологічними особливостями РПК, які у сукупності визначають клінічний перебіг та індивідуальний прогноз пухлинної хвороби.

На підставі комплексної оцінки СР- та NO-генеруючої активності у хворих на РПК встановлено її значно вищий рівень у пухлині (відповідно у 4,0 та 9,3 разів) порівняно з прилеглою до пухлини незміненою слизовою оболонкою кишки, а також у нейтрофілах (в 1,5 та 4,3 разів) і тромбоцитах периферичної крові (відповідно в 10,7 та 4,1 разів) порівняно з показниками здорових донорів, що вказує на системний характер змін редокс-факторів при непластичному рості. Після проведення НПТ/НХПТ рівень СР- та NO-генеруючої активності в пухлині та формених елементах периферичної крові достовірно зменшується.

Доповнено наукові дані щодо зв'язку інтенсивності генерування СР та NO в пухлині, нейтрофілах та тромбоцитах периферичної крові з клініко-морфологічними особливостями РПК: типом росту, глибиною інвазії, розміром пухлини, ступенем диференціювання, частотою лімфогенного метастазування, що вказує на зв'язок редокс-факторів з агресивністю пухлинного процесу. Вперше встановлено, що у випадках проведення хворим на РПК радіомодифікації НХПТ тегафуrom та L-аргініну гідрохлоридом рівень NO-генеруючої активності в біопатії пухлини  $>2,10$  нМ/г·хв є позитивним предиктивним маркером ефективності лікування. Встановлено, що рівень активності НАДФ-Н-оксидази у тромбоцитах периферичної крові  $>1,50$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв через 1 міс. після операції негативно асоційований з 3-річною виживаністю хворих на РПК, що вказує на прогностичне значення цього біологічного маркера.

Вперше виконано комплексний аналіз динаміки змін рівня експресії і особливостей розподілу в пухлинній тканині молекулярно-біологічних маркерів ангиогенезу (Анг-2), апоптозу (Вах), проліферації (Кі-67), індукцйбельної форми NO-синтази (iNOS) під впливом різних схем НПТ/НХПТ, що вказує на гетерогенний характер молекулярно-біологічних змін у тканині РПК.

Вперше встановлено особливості лікувального патоморфозу РПК після НХПТ на фоні радіомодифікації із застосуванням тегафуру, L-аргініну гідрохлориду та наведено його якісну та кількісну характеристику в порівнянні із такими при стандартних методиках лікування. Вперше досліджено зв'язок ступеня лікувального патоморфозу при різних схемах лікування хворих з редокс показниками пухлини; рівнем експресії в пухлинній тканині Анг-2, Вах, Кі-67, iNOS; показниками окисних модифікацій ДНК, білків і ліпідів. Визначено ряд молекулярно-біологічних маркерів, пов'язаних із прогнозом клінічного перебігу хвороби у хворих на РПК I-III стадій, які вперше ідентифіковані в якості додаткових критеріїв для призначення ад'ювантної хіміотерапії: рівень експресії Анг-2  $>49,0$  ум. од. та Кі-67  $>51,0$  ум. од. у пухлині до лікування, СР-генеруюча активність НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів крові після 18-20 сеансу ПТ  $>0,31$  нМ/10<sup>5</sup> кл·хв.

Вперше показано, що комплексний аналіз СР-генеруючої активності в пухлині до лікування та вихідного рівня і динаміки екскреції 8-оксогуаніну з сечею у хворих на РПК через добу після першої фракції ПТ є обґрунтованою підставою для оцінки прогноза чутливості пухлини до ПТ (чутливість тесту 86,7 %, специфічність – 76,4 %) і корекції персоніфікованої лікувальної тактики на ранніх етапах лікування.

**Практичне значення одержаних результатів.** Дістали подальшого розвитку актуальні питання індивідуалізованого лікування хворих на РПК, які враховують не тільки основні клініко-морфологічні характеристики, але і встановлені до- та впродовж лікування показники генерування пухлиною і форменими елементами крові СР та NO, рівень експресії і динаміку пов'язаних з ними молекулярно-біологічних маркерів Анг-2, Ki-67, iNOS та Вах та інтенсивність екскреції окисних форм ДНК.

Продемонстровано клінічну ефективність і безпечність введення хворим на РПК при НХПТ попередника біологічного синтезу NO L-аргініну гідрохлориду в комплексі радіомодифікації та розроблено покази до його застосування. Застосування L-аргініну гідрохлориду в комплексі радіомодифікації покращує показники серцево-судинної діяльності та сприяє зниженню гепатотоксичних ефектів НХПТ. Проведені дослідження дозволили вперше розробити і впровадити новий спосіб радіомодифікації під час НХПТ хворих на РПК на основі перорального прийому антиметаболіту фторпіримідинового ряду і системного введення медикаментозного засобу, що містить L-аргініну гідрохлорид в якості субстрату для ендogenous синтезу NO (Патент України на винахід № 111798 від 10.06.2016). Застосування радіомодифікації, згідно розроблених показів із врахуванням молекулярно-біологічних властивостей пухлини, дозволяє підвищити рівень лікувального патоморфозу РПК і покращити віддалені результати лікування хворих на РПК.

Розроблені, апробовані та впроваджені в лікувально-діагностичний процес предиктивні критерії рівня чутливості РПК до НХПТ, які дозволяють сформулювати прогноз вже через добу після першої фракції опромінення: рівень добової екскреції 8-охоG з сечею до лікування і зростання його рівня через добу після початку ПТ та показник СР-генеруючої активності НАДФ·Н-оксидази в пухлині (Патент України на винахід № 108722 від 25.05.2015). Встановлено, що концентрація дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) в сироватці крові дозволяє оцінити рівень вже реалізованого пошкоджуючого впливу НПТ/НХПТ на пухлину, а маркери окисних модифікацій білків (ОМБ) є одним із ранніх та інформативних індикаторів променевого пошкодження тканин, що обґрунтовує вивчення динаміки їх змін у хворих на РПК, яким призначена ПТ.

Вперше запропоновані критерії прогнозування віддалених наслідків лікування хворих на РПК на основі визначення рівня і динаміки редокс-показників пухлини і формених елементів крові, зокрема їх СР- та NO-генеруючої активності, а також рівня експресії молекулярних маркерів iNOS, Ki-67, Анг-2 в пухлинній тканині. Впроваджено в клінічну практику визначення молекулярних маркерів Ki-67, Анг-2, Вах та iNOS в тканині пухлини для оцінки біологічних особливостей РПК з метою вибору індивідуалізованої тактики лікування.

Розроблено та впроваджено спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на РПК на основі показників 3-річної виживаності із врахуванням СР-генеруючої активності нейтрофільних гранулоцитів (Патент України на корисну модель № 102389 від 26.10.2015).

Використання запропонованих способів прогнозування ефективності НХПТ у хворих на РПК забезпечує вчасне проведення відповідної корекції лікувальної програми з метою досягнення максимального ступеня лікувального патоморфозу пухлини, в тому числі за рахунок радіомодифікації, дозволяє уникнути зайвих витрат часу і матеріальних ресурсів у зв'язку з необґрунтованим застосуванням низькоефективних лікувальних заходів.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в практику і застосовуються в Івано-Франківському клінічному онкологічному диспансері, Національному інституті раку МОЗ України, клінічній лікарні «Феофанія» Державного управління справами, Коломийському міжрайонному онкологічному диспансері.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є закінченим самостійним дослідженням, реалізацією ідей автора. Збір та аналіз первинних матеріалів, які лягли в основу дослідження, інтерпретація отриманих результатів, наукові положення, висновки та практичні рекомендації є результатом самостійних досліджень, виконаних автором на базі Івано-Франківського обласного клінічного онкодиспансеру (КЗ «Прикарпатський клінічний онкологічний центр»). Автором проведено загальноклінічне обстеження, забір і підготовку матеріалу для біохімічних, морфологічних, імунофлуоресцентних досліджень та спектроскопії ЕПР, визначення показів та схеми проведення променевої та хіміотерапії у 100 % хворих, медикаментозна та хірургічне лікування 72 % хворих на РПК з подальшим їх моніторингом. ЕПР-спектроскопічні, імунофлуоресцентні дослідження, вивчення маркерів окиснення ДНК виконані автором сумісно з співробітниками лабораторії проблем метастатичного мікрооточення ІЕПОР ім. Р.С. Кавецького НАН України (д.б.н. А.П. Бурлака). Морфологічні дослідження виконані у співпраці з доцентом кафедри патоморфології та судової медицини ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» к.мед.н. М.М. Багриєм. Автором самостійно зібрані та проаналізовані вітчизняні та закордонні літературні джерела за тематикою дисертації, виконана статистична обробка, аналіз та узагальнення результатів власних досліджень з наступною публікацією їх у профільних виданнях. У роботах, опублікованих у співавторстві, використано фактичний матеріал автора, а узагальнення та висновки проведені сумісно. При написанні дисертації не були використані ідеї та розробки співавторів публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були висвітлені в доповідях та обговоренні на: II (63) Міжнародному конгресі студентів і молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2009 р.), Обласній науково-практичній конференції «Вчені Прикарпаття – сталому розвитку краю» (Івано-Франківськ, 2012 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Пріоритети розвитку медичних наук у XXI столітті» (Одеса, 2014 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів» (Львів, 2014 р.), XV конгресі СФУЛГ (Чернівці, 2014 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «II Прикарпатський хірургічний форум» (Яремче, 2014 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю



«Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (Запоріжжя, 2015 р.), XIX міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми клінічної, теоретичної, профілактичної медицини, стоматології та фармації» (Одеса, 2015 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні підходи в лікуванні онкологічних хворих» (Вінниця, 2015 р.), Підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2015 р.), Науково-практичній конференції за участю міжнародних фахівців «Сучасні питання діагностики та терапії в ядерній медицині» (Харків, 2015 р.), Європейському онкологічному конгресі European Cancer Congress (Відень, Австрія, 2015 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах» (Київ, 2015 р.), Третій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015 р.), Науково-практичній конференції «Новітні методи діагностики та лікування онкологічних хворих» (Харків, 2015 р.), XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016 р.), Міжнародній науковій конференції «Інтегральні клініко-патогенетичні підходи в діагностиці і терапії раку» (Київ, 2016 р.), XII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016 р.), Обласній науково-практичній конференції «Інтелектуальний потенціал краю і проблеми інтелектокористування» (Івано-Франківськ, 2016 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2016 р.), Науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології» (Тернопіль, 2016 р.), VII Національному конгресі патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 2016 р.), X міжнародній конференції Європейської федерації спілок спектроскопії електронного парамагнітного резонансу (Торіно, Італія, 2016 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 56 наукових праць: 26 статей у профільних виданнях, затверджених ДАК України (з них 5, що входять до міжнародних наукометричних баз), 20 тез доповідей у збірках українських та міжнародних конференцій, конгресів та з'їздів, одержано 2 патенти на винахід та 1 патент на корисну модель, опубліковано 2 навчальні посібники та 2 інформаційні листи.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертацію викладено українською мовою на 354 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріал та методи дослідження, 5 розділів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій та списку використаних джерел, який налічує 393 посилання (91 кирилицею і 302 латиною) та додатків. Роботу ілюстровано 81 рисунком, 69 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріал і методи дослідження.** В основу дисертаційної роботи покладені результати комплексного обстеження і лікування 293 хворих на РПК I-III стадій, які отримали спеціальне лікування упродовж 2009-2016 рр. у відділенні пухлин органів шлунково-кишкового тракту і м'яких тканин (зав. відділенням Партикевич Ю.Д.) Івано-Франківського обласного клінічного онкологічного диспансеру (КЗ «Прикарпатський клінічний онкологічний центр», головний лікар Романчук В.Р.).

**Клінічні методи обстеження хворих.** Всім хворим проведені клінічні, лабораторні та інструментальні обстеження згідно стандартів діагностики і лікування, затверджених МОЗ України, для визначення розповсюдженості РПК. Для з'ясування розмірів та ступеня поширення РПК використовували ректороманоскопію, фіброколоноскопію, прокто- та іригографію, комплекс ультразвукових технологій, СКТ/МРТ з контрастуванням. Загальний стан хворих (Performance Status) оцінювали за шкалами ECOG-BOO3 і Карновського. Хворі були інформовані про проведення дослідження і надали згоду на використання клінічного матеріалу в дослідницьких цілях.

Безпосередню клінічну ефективність НПТ та НХПТ у хворих на РПК оцінювали за динамікою розмірів новоутворення, які реєстрували при СКТ чи МР-обстеженні хворих до і після лікування, використовуючи міжнародні критерії системи RECIST 1.0 та RECIST 1.1 (з 2010 р.). Оцінку гематологічних та біохімічних показників загальної токсичності НПТ і НХПТ проводили до початку та на етапах лікування хворих згідно критеріїв BOO3 за шкалою Common Terminology Criteria for Adverse Events NCIC v. 4.0 (2009 р.), ранніх і пізніх побічних ефектів НПТ і НХПТ – згідно критеріїв RTOG/EORC (1995 р.).

**Критерії включення хворих у групи обстеження і лікування.** Відбір хворих для включення у групи відповідного обстеження і лікування проводили за наступними критеріями: гістологічна верифікація РПК (залозиста карцинома), I-III стадія пухлинного процесу; вік хворих не більше 80 років; задовільний стан хворих; інформована згода на участь у дослідженні; відсутність віддалених метастазів, первинно-множинного характеру пухлинного ураження ПК, інших злоякісних пухлин, виразкової хвороби шлунка або 12-палої кишки в стадії загострення.

**Клінічна характеристика хворих.** Вік обстежених хворих на РПК I-III стадій коливався від 34 до 80 років і в середньому становив  $62,6 \pm 0,5$  роки, середній вік чоловіків був  $61,7 \pm 0,7$  рік, жінок –  $63,7 \pm 0,7$  роки. Серед хворих незначно переважали чоловіки (154/52,6 %), жінок було 139 (47,4 %).

Як показали результати обстеження хворих, тривалість хвороби від появи перших симптомів до початку лікування коливалась у межах 1-13 місяців. Частота та характеристика симптомів були різними: патологічні виділення із ПК складала 80,2 %, втрата маси тіла - 71,1 %, тенезми -68,6 %, явища кишкового дискомфорту - 58,7 %, біль - 43,0 %, симптоми компенсованої і субкомпенсованої непрохідності – відповідно 47,1 % і 29,7 %. У 96,4 % хворих пухлина локалізувалась в ампулярному відділі ПК з більш частим ураженням його

дистальної частини. Пухлини з протяжністю по слизовій оболонці прямої кишки (у подальшому – розмір пухлини) більше 5 см були діагностовані у 167 (57,0 %), менші за розмірами або рівні 5 см – у 126 (43,0 %). В усіх хворих верифікована аденокарцинома різного ступеня диференціювання з перевагою кількості пухлин помірною ступеня диференціювання (76,8 %), частка яких коливалась у різних групах від 60,4 % до 87,8 %.

Уточнення розповсюдженості РПК (коди МКХ-10: C-19, C-20, C-21) здійснювали на основі клінічних обстежень та на підставі морфологічного дослідження операційного матеріалу. Ступінь поширення пухлинного процесу визначали за міжнародною класифікацією пухлин TNM (6-те видання, 2002 р.) – табл. 1. Розподіл хворих за стадією і за методами лікування показав, що серед обстежених найбільше було хворих на РПК II стадії – 152 (51,9 %), кількість хворих на РПК I та III стадій була значно меншою і становила, відповідно, 68 (23,2 %) та 73 (24,9 %). Неoad’ювантні методи терапії були призначені 208 хворим, з яких НПТ – 111 (53,36 %) хворим II групи, НХПТ – 48 (23,07 %) хворим III групи, НХПТ з радіомодифікацією – 49 (23,55 %) хворим IV групи.

Таблиця 1

## Розподіл хворих на РПК за стадією пухлинного процесу

Стадія РПК за TNM	Групи хворих				
	I	II	III	IV	Всього
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
$T_2N_0M_0$	17 (20,0)	33 (29,7)	10 (20,9)	8 (16,3)	68 (23,2)
$T_3N_0M_0$	40 (47,1)	48 (43,2)	19 (39,6)	25 (51,0)	132 (45,1)
$T_4N_0M_0$	6 (7,1)	7 (6,3)	5 (10,4)	2 (4,1)	20 (6,8)
$T_2N_{1-2}M_0$	3 (3,5)	4 (3,6)	1 (2,1)	3 (6,1)	11 (3,8)
$T_3N_{1-2}M_0$	16 (18,8)	18 (16,2)	9 (18,8)	9 (18,4)	52 (17,7)
$T_4N_{1-2}M_0$	3 (3,5)	1 (0,9)	4 (8,3)	2 (4,1)	10 (3,4)
Разом, n (%)	85 (100,0)	111(100,0)	48 (100,0)	49 (100,0)	293 (100,0)

**Методи лікування хворих на РПК I-III стадії.** Залежно від методів лікування хворі на РПК були розподілені на 4 групи (табл. 2). Протокол хірургічного лікування хворих на РПК включав стандартні радикальні оперативні втручання: передня резекція ПК (n=49), низька передня резекція ПК (n=24) операція Гартмана (n=30), операція Кеню-Майлса (n=66), червонно-анальна резекція ПК (n=124) з виконанням тотальної мезоректумектомії.

Таблиця 2

## Розподіл хворих на РПК I-III стадій (n=293) залежно від методів лікування

Група хворих	Методи лікування хворих	Кількість хворих (п, абс.)
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Радикальне хірургічне лікування без неoad'ювантної терапії.</b></li> <li>- <b>Ад'ювантна хіміотерапія (АХТ):</b> згідно стандартних показів – 6 курсів хіміотерапії за режимом Мауо: кальцію фолінат (20 мг/м<sup>2</sup> в/в струменево з наступним болусом Флуороурацилу 425 мг/м<sup>2</sup>) в 1-5 дні, з інтервалом 28 днів.</li> </ul>	85
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Неoad'ювантна променева терапія (НПТ):</b> дистанційне гама-опромінення на ділянку пухлини (сумарна вогнищева доза 36-40 Гр, разова вогнищева доза – 2-2,5 Гр, 5 сеансів на тиждень) без застосування радіомодифікаторів (апарати «АГАТ-Р1» і «Cobalt-60»).</li> <li>- <b>Хірургічне лікування через 4-6 тижнів.</b></li> <li>- <b>АХТ у тому ж режимі.</b></li> </ul>	111
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Неoad'ювантна хіміо-променева терапія (НХПТ):</b> гама-опромінення на фоні хіміорадіомодифікації фторафуром з розрахунку 800 мг на добу за 2 прийоми (зранку і увечері) хворим масою до 70 кг або 1200 мг за 3 прийоми хворим масою більше 70 кг щодня упродовж усього курсу НХПТ.</li> <li>- <b>Хірургічне лікування через 4-6 тижнів.</b></li> <li>- <b>АХТ у тому ж режимі.</b></li> </ul>	48
IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Неoad'ювантна хіміо-променева терапія (НХПТ) з L-аргініном:</b> гама-опромінення на ділянку пухлини на фоні радіомодифікації: окрім фторафуру в зазначеному вище дозуванні, внутрішньовенно вводили тівортін (4,2 % розчин L-аргініну гідрохлориду) у дозі 100 мл за 60 хв до початку сеансу опромінення.</li> <li>- <b>Хірургічне лікування через 4-6 тижнів.</b></li> <li>- <b>АХТ у тому ж режимі.</b></li> </ul>	49

**Методи морфологічного дослідження біопсійного та операційного матеріалу.** Біоптати пухлин і фрагменти видалених пухлин піддавали класичній морфологічній проводці після їх фіксації у 10 % нейтральному забуференому формаліні з подальшою заливкою у парафінові блоки. З них робили гістологічні зрізи товщиною 4-5 мкм, які фарбували гематоксиліном та еозином. Гістоструктуру та ступінь диференціювання пухлини оцінювали за класифікацією пухлин ВООЗ «Патологія та генетика пухлин травної системи» (2010 р.). Для характеристики стану сполучнотканинного компоненту РПК до та після НПТ/НХПТ застосовували гістохімічні методи: фарбування зрізів за Масоном – для виявлення колагенових волокон, альціановим синім за Стідменом – для виявлення глікозаміногліканів, ШИК-реакцію – для виявлення глікопротеїнів (Саркисов Д.С., 1994).

**Методи оцінки лікувального патоморфозу РПК.** Для оцінки лікувального патоморфозу РПК застосовано комплекс методичних підходів. Ступінь лікувального патоморфозу пухлин оцінювали за класифікацією Г.О. Лавникової (1979 р.). Для більш детальної характеристики лікувального патоморфозу у пухлинах після НПТ та НХПТ застосовано морфометричний метод згідно рекомендацій К.А. Галахіна та співав. (2000 р.) з використанням морфометричної програми Image Tool 3.0 for Windows. Для оцінки змін вмісту нессульфатованих глікозаміногліканів і глікопротеїнів у сполучнотканинному компоненті пухлин проведено денситометричне дослідження гістологічних зрізів, результати якого визначали в умовних одиницях. Всі морфологічні, морфометричні дослідження пухлин та оцінку лікувального патоморфозу РПК проводили на кафедрі патоморфології та судової медицини ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет (зав. кафедрою д.мед.н., проф. Михайлюк І.О.).

**Імунофлуоресцентний метод дослідження РПК.** Дослідження рівня експресії маркерів (Вах), проліферації (Ki-67), ангиогенезу (Анг-2), синтезу NO (iNOS) проводили у гістологічних зрізах біоптатів пухлин та інтактній слизовій оболонці ПК хворих на РПК. В якості первинних антитіл використовували анти-Вах (клон В-9), анти-Ki-67 (клон MIB-1), анти-Анг-2 (клон Н-11) та анти-NOS2 (клон С-11) антитіла (Santa Cruz, CA, USA). В якості вторинних флуоресцеїн-вмісних використовували антитіла Alexa Fluor 546 та Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA). Дослідження рівня експресії маркерів проводили з використанням лазерного конфокального скануючого мікроскопа Zeiss LSM 510 з модулем 32-канального автоматичного поліхроматичного МЕТА-детектора (GaAsP) та імерсійним об'єктивом 40X/1.4NA. Кількісний аналіз експресії молекулярних маркерів проводили з використанням медичного програмного забезпечення обробки цифрових зображень ImageJ 1.48, результати виражали в умовних одиницях.

**Метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР)** застосували для дослідження інтенсивності генерування СР та NO в тромбоцитах, нейтрофілах периферичної крові та у фрагментах пухлини і прилеглої до пухлини слизової оболонки кишки (ППСОК) хворих на РПК. Забір зразків пухлини і ППСОК проводили шляхом біопсії пухлини перед початком НПТ/НХПТ та через 4-6 тижнів після її завершення (операційний матеріал). Забір периферичної крові проводили до початку лікування, на етапах НПТ/НХПТ, безпосередньо перед радикальною операцією та через 1 міс. після неї. Кількісне визначення СР-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів, тромбоцитів периферичної крові та у зразках тканин проводили методом ЕПР при температурі 20° С з використанням спінового уловлювача 1-гідрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидину. Концентрацію NO в тканинах та рівень його синтезу індукційно NO-синтазою нейтрофілів і тромбоцитів крові вимірювали методом ЕПР за температури рідкого азоту (77 К) із застосуванням спінового уловлювача диетилдитіокарбамату («Sigma», США) (Burlaka A.P. et al., 2015). Результати при дослідженні клітин крові та зразків тканин виражали відповідно у «нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв» та «нМ/г·хв».

**Біохімічні методи дослідження.** Маркери окисних модифікацій ДНК, білків та ліпідів у хворих на РПК визначали до початку лікування, під час проведення НПТ/ХПТ та через 4-6 тижнів після її завершення (перед операцією).

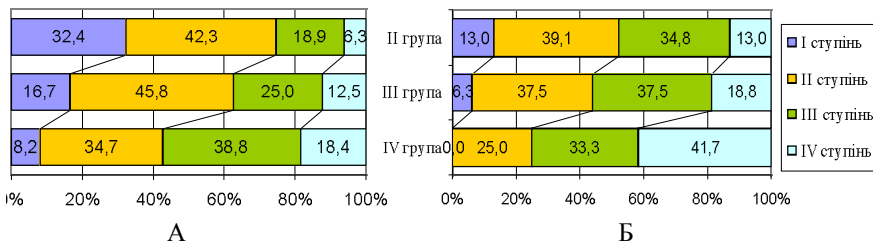
Ступінь окисного пошкодження ДНК оцінювали спектрофотометрично за методом Shigenaga M.K. (1989 р.) шляхом визначення в добовій сечі молекулярних маркерів окисних модифікацій гуаніну в ДНК – 8-оксогуаніну (8-охоG) та 8-гідрокси-2'-дезоксогуанозину (8-охоdGu), результат виражали в «нМ/доба-г маси тіла». Рівень ОМБ оцінювали в сироватці крові за методом R.L. Levine в модифікації Е.Е. Дубініної (2006). Визначали оптичну щільність 2,4-динітрофенілгідрозонів (в одиницях оптичної щільності на 1 мл): альдегід-динітрофенілгідрозонів при  $\lambda=356$  і 430 нм та кетон-динітрофенілгідрозонів при  $\lambda=370$  і 530 нм. Інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) оцінювали шляхом спектрофотометрії за вмістом у сироватці крові МДА згідно методу С.Н. Коробейникової (1988 р.) та ДК за методом В.Б. Гаврилова (1988 р.). Результати виражали відповідно в мкмоль/л та умовних одиницях.

**Статистичні методи дослідження.** Статистичний аналіз одержаних результатів проводили за допомогою програм Statistica v. 6.1 (Statsoft Inc., США) та GraphPad Prism 6 for Windows, v. 6.1 (GraphPad SoftWare inc., США). Для підтвердження достовірності даних використовували t-критерій Ст'юдента; тести Манна-Уїтні і Вілкоксона. Кореляційний аналіз проводили шляхом розрахунку коефіцієнта кореляції Спірмена (r), критерія  $\chi^2$  Пірсона. Вживаність хворих оцінювали за методом Каплана-Мейера, достовірність відмінностей між кривими – за log-rank test. Прогностичну модель ефективності лікування сформували шляхом регресійного аналізу за Коксом. Достовірними вважали розбіжності при  $p<0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Дослідження лікувального патоморфозу пухлин після різних методів неoad'ювантної терапії хворих на РПК.** Вивчення особливостей лікувального патоморфозу проводили в пухлині ПК та лімфатичних вузлах, видалених через 4-6 тижнів після неoad'ювантної ПТ і ХПТ хворих II - IV груп. Загалом, у всіх пухлинах встановлені дистрофічні і некротичні зміни різного ступеня з резорбцією пухлинної паренхіми та заміщенням її сполучною тканиною, зростанням васкуляризації, інфільтрацією строми переважно клітинами лімфоїдного ряду та макрофагами, відмічено явища облітеруючої васкулопатії.

Антибластомний ефект лікування був найбільш вираженим у пацієнтів IV групи, що супроводжувалось девіталізацією пухлинної паренхіми як у поверхневих, так і в більш глибоких зонах пухлин, порівняно з такими у хворих II-III груп. Частота лікувального патоморфозу III і IV ступенів у пухлинах і метастатично-уражених лімфатичних вузлах хворих IV групи була найвищою з-поміж інших груп і складала у пухлинах  $57,1\pm 4,9\%$  проти  $31,3\pm 4,8\%$  в III групі та  $25,2\pm 3,6\%$  в II групі хворих ( $p<0,05$ ), при цьому додатковий пошкоджуючий вплив НХПТ на стінку прилягаючої візуально незміненої кишки не виявлено (рис. 1 а, б).

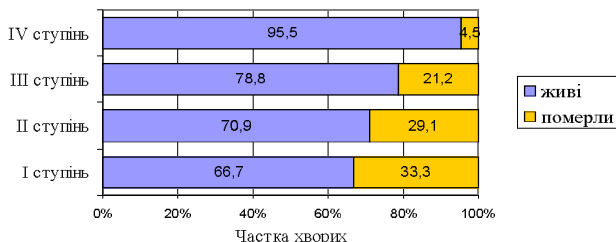


**Рис. 1.** Розподіл (%) хворих на РПК II-IV груп залежно від ступеня лікувального патоморфозу в первинній пухлині (А) та регіонарних лімфатичних вузлах (Б)

Значна девіталізація пухлинної паренхіми в цих зонах після курсу НХПТ у хворих IV групи проявлялась суттєвим зменшенням частки непошкодженої паренхіми, яка в середньому становила  $10,29 \pm 1,89$  %, що у 1,53 раз менше порівняно з такою у хворих III групи ( $15,76 \pm 2,11$  %;  $p < 0,05$ ) і в 1,93 раз – порівняно з хворими II групи ( $19,81 \pm 2,34$  %;  $p < 0,001$ ).

В результаті порівняльних гістохімічних досліджень пухлин після неoad'ювантного лікування хворих встановлено не лише достовірне зменшення стромальних глікопротеїнів на фоні девіталізації пухлинної паренхіми, але і розростання колагенових волокон, здебільшого у центральній частині пухлини, у хворих IV групи порівняно з II-III групами, що підтверджує оптимальний лікувальний патоморфоз пухлин у хворих IV групи.

Крім того, нами встановлено, що у хворих на РПК з III і IV ступенями лікувального патоморфозу, незалежно від отриманого на першому етапі лікування курсу НПТ/НХПТ, достовірно зростала 3-річна загальна виживаність ( $p = 0,021$ ). Ці дані свідчать про важливе прогностичне значення оцінки чутливості/резистентності РПК до вказаного лікування і обґрунтовують доцільність його використання в якості одного з показників ефективності неoad'ювантного лікування (рис. 2).



**Рис. 2.** Розподіл (%) хворих залежно від ступеня лікувального патоморфозу пухлин після НПТ/НХПТ та 3-річної загальної виживаності

Отже, можна стверджувати, що за якісними і кількісними показниками лікувального патоморфозу аденокарцином ПК і регіонарних лімфатичних вузлів,

індукованого НХПТ на фоні радіомодифікації, створюються необхідні умови для абластики хірургічного втручання, що, у свою чергу, дозволяє прогнозувати низький ризик розвитку рецидивів і метастазів.

**Характеристика окремих параметрів окисно-відновного статусу пухлин у хворих на РПК.** Нами досліджено інтенсивність генерування СР та базовий рівень NO-генеруючої активності у тканині РПК та ППСОК. Інтенсивність генерування СР у тканині РПК до лікування становила  $1,56 \pm 0,14$  нМ/г·хв, достовірно перевищуючи аналогічний показник у ППСОК ( $0,41 \pm 0,51$  нМ/г·хв,  $p < 0,001$ ). СР-генеруюча активність достовірно зростала при зменшенні ступеня диференціювання РПК (з  $1,22 \pm 0,11$  нМ/г·хв при  $G_{1,2}$  до  $1,69 \pm 0,20$  нМ/г·хв при  $G_3$ ,  $r = -0,64$ ;  $p = 0,025$ ), а також при збільшенні глибини інвазії пухлини (з  $1,38 \pm 0,12$  нМ/г·хв при  $T_{1,2}$  до  $1,79 \pm 0,16$  нМ/г·хв при  $T_{3,4}$ ,  $r = 0,56$ ;  $p = 0,03$ ) та ендоефітному типі росту ( $p = 0,011$ ) (табл. 3). З іншими клініко-морфологічними категоріями РПК (стать, вік хворих, розмір пухлини, стан регіонарних лімфатичних вузлів, стенозування ПК) достовірних змін не виявлено.

Таблиця 3

**Показники СР- і NO-генеруючої активності пухлин залежно від клінічних і морфологічних особливостей РПК**

Фактор	Показники редокс-стану тканини РПК	
	СР-генеруюча активність (нМ/г·хв), $M \pm m$	NO-генеруюча активність (нМ/г·хв), $M \pm m$
Стать: Чоловіки (n=45)	$1,51 \pm 0,32$	$2,08 \pm 0,23$
Жінки (n=37)	$1,58 \pm 0,37$	$2,03 \pm 0,32$
Вікова група: $\leq 60$ р (n=36)	$1,58 \pm 0,28$	$2,11 \pm 0,23$
$> 60$ р (n=46)	$1,52 \pm 0,31$	$2,02 \pm 0,18$
Тип росту: екзофітний (n=38)	$1,10 \pm 0,15$	$1,98 \pm 0,14$
змішаний і ендоефітний (n=44)	$1,73 \pm 0,23^*$	$2,07 \pm 0,24$
Ступінь диференціювання: $G_{1,2}$ (n=63)	$1,22 \pm 0,11$	$1,85 \pm 0,16$
$G_3$ (n=19)	$1,69 \pm 0,20^*$	$2,29 \pm 0,25^*$
Глибина інвазії: $T_{1,2}$ (n=25)	$1,38 \pm 0,12$	$2,14 \pm 0,23$
$T_{3,4}$ (n=57)	$1,79 \pm 0,16^*$	$1,92 \pm 0,17$
Розмір пухлини: $\leq 5$ см (n=28)	$1,59 \pm 0,12$	$2,05 \pm 0,14$
$> 5$ см (n=54)	$1,56 \pm 0,14$	$2,03 \pm 0,23$
Стан регіонарних лімфатичних вузлів: $N_0$ (n=55)	$1,55 \pm 0,11$	$1,85 \pm 0,15$
$N_{1,2}$ (n=27)	$1,61 \pm 0,15$	$2,30 \pm 0,21^*$
Стенозування кишки: є (n=48)	$1,54 \pm 0,14$	$2,15 \pm 0,15$
немає (n=34)	$1,57 \pm 0,17$	$1,97 \pm 0,24$

Примітка. \* -  $p < 0,05$  між відповідними показниками у групі

Базовий рівень NO-генеруючої активності в пухлинній тканині ПК перевищував показник в ППСОК майже на порядок, складаючи, відповідно,  $2,05 \pm 3,2$  проти  $0,22 \pm 0,29$  нМ/г·хв ( $p < 0,001$ ), зростав при зменшенні ступеня диференціювання пухлини ( $G_1 - 1,05 \pm 0,11$  нМ/г·хв;  $G_2 - 1,28 \pm 0,13$  нМ/г·хв та  $G_3$



–  $1,69 \pm 0,20$  нМ/г·хв;  $r = -0,61$ ;  $p = 0,034$ ) та метастатичному ураженні регіонарних лімфатичних колекторів ( $N_0 - 1,85 \pm 0,15$  нМ/г·хв,  $N_{1,2} - 2,30 \pm 0,21$ ;  $r = 0,59$ ;  $p = 0,044$ ). Статистичного значимого зв'язку рівня NO-генеруючої активності в пухлинній тканині ПК з іншими клініко-морфологічними показниками РПК не виявлено.

При дослідженні інтенсивності генерування CP та NO у пухлинній тканині, отриманій під час оперативного втручання, у II-IV групах хворих зареєстровано суттєве її зниження у порівнянні з такою до лікування (табл. 4).

Таблиця 4

**Показники CP- та NO-генеруючої активності  
тканин РПК до і після лікування**

Показники	Групи хворих	Показники активності, (нМ/г·хв)	
		Біоптати пухлин до лікування (M±m)	Операційний матеріал після неoad'ювантної терапії (M±m)
CP-генеруюча активність	II (n=40)	1,57±0,14	1,15±0,12°
	III (n=41)	1,50±0,17	1,06±0,13°
	IV (n=42)	1,58±0,15	1,25±0,11°
NO-генеруюча активність	II (n=40)	2,01±0,22	1,05±0,15°*
	III (n=41)	2,09±0,20	0,96±0,12°*
	IV (n=42)	2,06±0,21	1,41±0,16°

Примітки: ° –  $p < 0,05$  порівняно з показниками до лікування; \* –  $p < 0,05$  порівняно з показниками IV групи хворих

Зазначимо, що у хворих IV-ї групи NO- ( $1,41 \pm 0,16$  нМ/г·хв) та CP-генеруюча активність ( $1,25 \pm 0,11$  нМ/г·хв) в пухлині були вищими порівняно з такими у хворих II та III груп, проте статистично-значимою була лише різниця інтенсивності генерування NO. Враховуючи отримані результати, у подальшому досліджено показники CP- та NO-генеруючої активності в пухлині з урахуванням застосованої схеми неoad'ювантної терапії та ступеня лікувального патоморфозу (табл. 5).

Таблиця 5

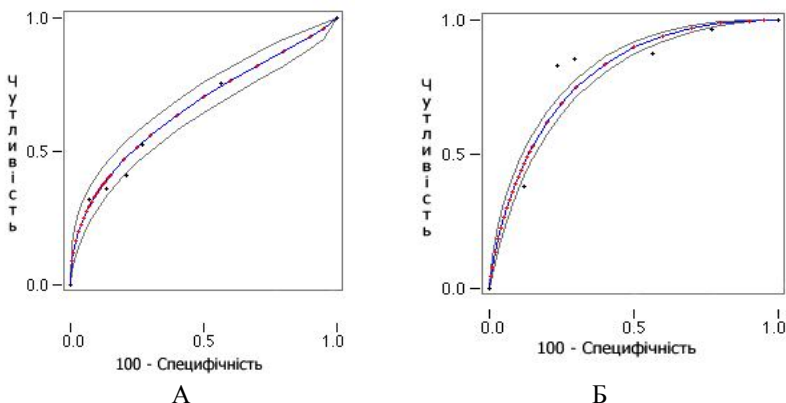
**Показники редокс-стану пухлини у хворих на РПК з різним ступенем лікувального патоморфозу**

Ступінь лікувального патоморфозу	Показники редокс-стану тканини РПК	
	CP-генеруюча активність (нМ/г·хв), M±m	NO-генеруюча активність (нМ/г·хв), M±m
II група хворих		
I-II (n=29)	0,88±0,19	2,11±0,13
III-IV (n=11)	1,71±0,36	2,00±0,24
p	<b>0,011</b>	0,172
III група хворих		
I-II (n=22)	0,92±0,19	1,95±0,14
III-IV (n=19)	1,67±0,28	2,10±0,25
p	<b>0,027</b>	0,106
IV група хворих		
I-II (n=20)	1,34±0,25	1,71±0,13
III-IV (n=22)	1,52±0,27	2,43±0,24
p	0,133	<b>&lt;0,001</b>

Як свідчать результати проведеного аналізу, СР-генеруюча активність достовірно збільшувалась у хворих II ( $p=0,011$ ) та III груп ( $p=0,027$ ) за умови вираженого лікувального патоморфозу (III-IV ступінь). Натомість, у хворих IV групи не відзначено достовірних змін показників СР-генеруючої активності ( $p=0,133$ ) залежно від ступеня лікувального патоморфозу. Що стосується змін NO-генеруючої активності пухлинної тканини після неoad'ювантної терапії, то зміни з високою достовірністю ( $p<0,001$ ) відзначені лише у хворих IV групи за умови III-IV ступеня лікувального патоморфозу.

Виявлено, що серед хворих II і III груп з низькою ефективністю лікування вихідний рівень СР-генеруючої активності в пухлині був достовірно нижчим, ніж у хворих з III-IV ступенями лікувального патоморфозу. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між СР-генеруючою активністю в пухлині та ступенем лікувального патоморфозу в II та III групах хворих ( $r=0,65$ ;  $p=0,013$  та  $r=0,51$ ;  $p=0,029$  відповідно). У хворих IV групи не зареєстровано достовірної різниці між показниками СР-генеруючої активності пухлини залежно від ступеня патоморфозу.

За допомогою ROC-аналізу визначено загальний пороговий рівень генерування СР, за умови перевищення якого прогнозується висока ефективність НПТ/НХПТ – 1,09 нМ/доба·г. Згідно рис. 3 А, розрахована площа під ROC-кривою – 0,665 (середня якість моделі), специфічність тесту – 69,6 %, чутливість – 41,5 %, що знижує його діагностичну цінність. Нами не встановлено прогностичну значимість визначення СР-генеруючої активності в пухлині до лікування у хворих II-IV груп.



**Рис. 3.** ROC-криві прогнозування ефективності НПТ/НХПТ в залежності від СР-генеруючої (А) та NO-генеруючої (Б) активності в пухлині до лікування у хворих на РПК (вказано 95%-довірчий інтервал)

Як вказувалось вище, аналіз показників генерування NO в пухлині залежно від ефективності лікування виявив достовірну різницю між такими лише у хворих IV групи ( $p<0,001$ ) (табл. 5). Пацієнти з найбільш високим вихідним рівнем

функціональної активності iNOS в пухлині –  $2,43 \pm 0,24$  нМ/г·хв (III-IV ступінь лікувального патоморфозу) проти  $1,71 \pm 0,13$  нМ/г·хв (I-II ступінь лікувального патоморфозу) виявились більш чутливими до НХПТ на фоні радіомодифікації із застосуванням препарату-попередника біологічного синтезу NO – L-аргініну гідрохлориду. Встановлено дискримінантну между показника NO-генеруючої активності в пухлині до лікування –  $2,10$  нМ/г·хв, при перевищенні якої прогнозується висока ефективність НХПТ із застосуванням радіомодифікації (площа під ROC-кривою –  $0,798$  (висока якість моделі), чутливість тесту  $82,5\%$ , специфічність –  $71,5\%$ ) (рис. 3 Б).

Слід зазначити, що прогностична значимість визначення NO-генеруючої активності в пухлині залежала від схеми доопераційної терапії. Так, у хворих I-II груп високі показники генерування NO в пухлині до лікування були асоційовані з несприятливим прогнозом 3-річної загальної та безрецидивної виживаності, тоді як у пацієнтів III групи статистично-значимого зв'язку не виявлено. Натомість, у хворих IV групи високий рівень генерування NO пухлиною виявився позитивним прогностичним і предиктивним фактором. Зокрема, встановлено, що застосування запропонованої методики радіомодифікації під час НХПТ у хворих на РПК з рівнем генерування NO  $>2,10$  нМ/г·хв (більше медіани) було значно більш ефективним як відносно параметрів лікувального патоморфозу, так і показників 3-річної загальної і безрецидивної виживаності, ніж у хворих з відповідним показником  $\leq 2,10$  нМ/г·хв (табл. 6).

Таблиця 6

**Зв'язок NO-генеруючої активності в пухлині хворих на РПК до лікування з показниками їх 3-річної виживаності**

NO-генеруюча активність (нМ/г·хв)	3-річна загальна виживаність, $M \pm m, \%$	Медіана загальної виживаності, міс.	$\chi^2; p$	3-річна безрецидивна виживаність, $M \pm m, \%$	Медіана безрецидивної виживаності, міс.	$\chi^2; p$
<b>I група хворих</b>						
$\leq 2,10$	$65,7 \pm 7,5$	не досягнута	5,142; <b>0,046</b>	$61,7 \pm 7,1$	не досягнута	4,215; <b>0,022</b>
$> 2,10$	$42,2 \pm 6,1$	34,8		$37,5 \pm 4,2$	18,1	
<b>II група хворих</b>						
$\leq 2,10$	$77,5 \pm 9,1$	не досягнута	1,348; 0,346	$65,7 \pm 7,6$	не досягнута	4,141; <b>0,038</b>
$> 2,10$	$63,8 \pm 5,5$	не досягнута		$51,3 \pm 5,7$	33,4	
<b>III група хворих</b>						
$\leq 2,10$	$80,1 \pm 9,4$	не досягнута	2,415; 0,280	$64,2 \pm 8,1$	не досягнута	1,722; 0,222
$> 2,10$	$74,2 \pm 7,7$	не досягнута		$63,4 \pm 6,4$	не досягнута	
<b>IV група хворих</b>						
$\leq 2,10$	$75,6 \pm 6,2$	35,9	4,552; <b>0,017</b>	$68,4 \pm 6,7$	не досягнута	0,490; <b>0,014</b>
$> 2,10$	$89,6 \pm 7,4$	не досягнута		$82,5 \pm 9,2$	не досягнута	

Таким чином, хоча висока базова NO-генеруюча активність у пухлині визначає більш агресивний її фенотип, проте в умовах НХПТ з потенціюванням фторафуrom та L-аргініну гідрохлоридом вона посилює цитостатичний ефект застосованої терапії.

**Характеристика окремих параметрів окисно-відновного статусу формених елементів периферичної крові у хворих на РПК.** Функціональний стан тромбоцитів і нейтрофілів периферичної крові досліджували в якості можливих позапухлинних прогностичних факторів перебігу РПК, адже відомо, що процес активації тромбоцитів в значній мірі контролюється шляхом зміни активності їх NO-синтаз та СР-генеруючих НАДФ·Н-оксидаз, які діють як функціональні антагоністи (Pietraforte D. et al., 2014, Connolly G. et al., 2014).

Встановлено, що у хворих на РПК до лікування NO-генеруюча активність тромбоцитів в 4,0 рази вища у порівнянні з такою в умовно-здорових донорів ( $0,34 \pm 0,04$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв проти  $0,08 \pm 0,02$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв,  $p < 0,001$ ), в той час як рівень СР-генеруючої активності НАДФ·Н-оксидаз тромбоцитів перевищував показник донорів удесятеро ( $2,68 \pm 0,15$  нМ/10<sup>5</sup> проти  $0,25 \pm 0,02$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв,  $p < 0,001$ ). Таким чином, у хворих на РПК наявний функціональний дисбаланс з переважанням СР-генеруючої активності тромбоцитів, що може бути фактором, який сприяє формуванню агрегатів циркулюючих пухлинних клітин у крові та вторинних метастатичних осередків (Dangel O. et al., 2010). Зазначене підтверджується виявленням нами прямим кореляційним зв'язком між рівнем СР-генеруючої активності тромбоцитів у хворих на РПК та метастатичним ураженням лімфатичних вузлів ( $r = 0,67$ ;  $p = 0,045$ ). Крім того, рівень СР-генеруючої активності тромбоцитів корелював зі стадією пухлинного процесу ( $r = 0,74$ ;  $p < 0,05$ ) та розміром пухлини ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,05$ ). Не було зареєстровано зв'язку між СР-генеруючою активністю НАДФ·Н-оксидази тромбоцитів та статеві-віковою структурою хворих, ступенем диференціювання, глибиною інвазії РПК та рівнем експресії ракового ембріонального антигена. Натомість, рівень NO-генеруючої активності тромбоцитів у хворих на РПК знижувався із збільшенням глибини інвазії пухлини ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ) та з розвитком стенозування кишки пухлиною ( $r = -0,71$ ;  $p < 0,01$ ) і не корелював з іншими досліджуваними клініко-морфологічними показниками.

Сукупність отриманих результатів показала, що НПТ/НХПТ, в більшій мірі за умов радіомодифікації, та хірургічне видалення пухлини знижують СР-генеруючу активність тромбоцитів. Проте, і через місяць після операції в усіх групах хворих вона не досягала показника здорових донорів ( $p < 0,05$ ) (табл. 7).

На етапах лікування хворих на РПК динаміка змін СР- і NO-генеруючої активності тромбоцитів периферичної крові в аналогічні терміни спостереження мала протилежну спрямованість. Зниження функціональної активності НАДФ·Н-оксидази тромбоцитів, яке було статистично-значимим у хворих II-IV груп після 18-20-ти сеансів ПТ і через місяць після операції, незмінно супроводжувалося зростанням рівня генерування NO і навпаки.

Слід відзначити, що за умов пухлинного росту активація нейтрофілів реалізується за рахунок функціональної НАДФ·Н-оксидази, яка після взаємодії цитозольних компонентів з мембранним флавоцитохромом  $b_{558}$  продукує та переносить електрони на молекулярний кисень з утворенням СР. Нейтрофільні гранулоцити периферичної крові експресують так звану «фагоцитарну» форму НАДФ·Н-оксидази, яка має деякі структурні відмінності порівняно з «нефагоцитарною» НАДФ·Н-оксидазою тромбоцитів (Мальцева В.Н. и соавт., 2009; Gregory A.D. et al., 2011).

Таблиця 7

**СР- та NO-генеруюча активність тромбоцитів у хворих на РПК (нМ/10<sup>5</sup> кл.хв)**

Група хворих	Термін дослідження				
	до лікування M±m	I сеанс ПТ M±m	18-20 сеансів ПТ M±m	перед операцією M±m	I міс. після операції M±m
СР-генеруюча активність тромбоцитів					
II (n=25)	2,57±0,25	2,41±0,25	1,50±0,23*	2,28±0,21	1,72±0,22*
III (n=19)	2,72±0,26	2,12±0,25	1,56±0,18*	2,19±0,30	1,93±0,28*
IV (n=21)	2,76±0,27	1,95±0,18*	1,20±0,17*	1,44±0,21*	1,75±0,20*
NO-генеруюча активність тромбоцитів					
II (n=25)	0,30±0,03	0,38±0,03	0,40±0,03*	0,35±0,03	0,75±0,06*
III (n=19)	0,36±0,04	0,36±0,03	0,49±0,04*	0,45±0,04	0,66±0,05*
IV (n=21)	0,35±0,03	0,46±0,03*	0,66±0,05*	0,49±0,04*	0,78±0,05*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з показниками до лікування

У хворих на РПК до початку лікування СР-генеруюча активність НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів периферичної крові в середньому складала  $0,34 \pm 0,01$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв, NO-генеруюча активність iNOS –  $0,39 \pm 0,02$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв, перевищуючи відповідно в 1,6 ( $p=0,001$ ) та 4,3 рази ( $p < 0,001$ ) аналогічні показники донорів. СР-генеруюча активність нейтрофілів до лікування прямо корелювала з розмірами пухлини ( $r=0,54$ ;  $p < 0,01$ ) та стадією пухлинного процесу ( $r=0,76$ ;  $p < 0,05$ ), а рівень генерування NO зростає із зниженням ступеня диференціювання пухлини ( $r=-0,58$ ;  $p=0,041$ ) та при метастатичному ураженні лімфатичних вузлів ( $r=0,49$ ;  $p=0,019$ ) (табл. 8). З наведеної таблиці видно, що вплив НПТ/НХПТ та хірургічного лікування у хворих II-III груп проявлявся у зниженні СР-генеруючої активності нейтрофілів. У хворих IV групи виявлено підвищення активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів після I сеансу ПТ, з подальшим її різким зниженням, хоча через місяць після хірургічного лікування не було виявлено статистично-значимої відмінності зазначеного показника порівняно з таким у хворих II та III груп (табл. 8).

Таблиця 8

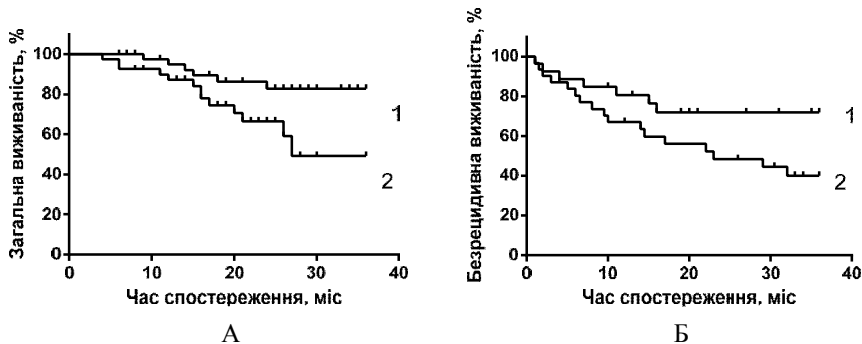
**Показники СР- та NO-генеруючої активності нейтрофілів у хворих на РПК (нМ/10<sup>5</sup> кл.хв) в різні терміни спостереження**

Група хворих	Термін дослідження				
	до лікування M±m	I сеанс ПТ M±m	18-20 сеансів ПТ M±m	перед операцією M±m	I міс. після операції M±m
СР-генеруюча активність нейтрофілів					
II (n=25)	0,33±0,02	0,23±0,01*	0,30±0,03	0,33±0,04	0,27±0,04
III (n=19)	0,36±0,03	0,23±0,03*	0,33±0,03	0,31±0,03	0,25±0,03*
IV (n=21)	0,32±0,02	0,69±0,06*	0,21±0,04*	0,36±0,05	0,22±0,03*
NO-генеруюча активність нейтрофілів					
II (n=25)	0,38±0,03	0,44±0,05	0,46±0,04	0,48±0,06	0,28±0,03*
III (n=19)	0,40±0,03	0,46±0,04	0,43±0,05	0,42±0,04	0,32±0,03
IV (n=21)	0,38±0,03	0,55±0,07*	0,73±0,06*	0,62±0,06*	0,29±0,04

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з показниками до лікування

NO-генеруюча активність iNOS нейтрофілів в ході НПТ/НХПТ в II і III групах хворих недостовірно зростала, тоді як у пацієнтів IV групи активність iNOS підвищувалась упродовж усього курсу ПТ, перевищуючи вихідне значення після 18-20 сеансу майже вдвічі ( $p < 0,001$ ). Через місяць після операції в II, III і IV групах хворих NO-генеруюча активність iNOS нейтрофілів була нижчою, ніж на етапі встановлення діагнозу, проте статистично достовірно – лише у пацієнтів II групи (табл. 8).

Важливим, на наш погляд, був аналіз 3-річної загальної та 3-річної безрецидивної виживаності хворих на РПК в залежності від рівня активності НАДФ-Н-оксидази та iNOS тромбоцитів та нейтрофілів периферичної крові до початку і в різні терміни лікування. Статистично-значимим виявився зв'язок між 3-річною загальною виживаністю хворих та активністю НАДФ-Н-оксидази тромбоцитів через 1 міс. після операції: за активності  $< 1,50 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв 3-річна загальна виживаність становила 82,6%, медіана виживаності не досягнута; за активності  $> 1,50 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв – 49,2%, медіана виживаності складала 27 міс; log-rank тест,  $\chi^2 = 4,768$ ;  $p = 0,029$  (рис. 4 А). Натомість, достовірного зв'язку показників 3-річної загальної виживаності з рівнем NO-генеруючої активності тромбоцитів на різних етапах спостереження у хворих на РПК не виявлено.



**Рис. 4.** Показники 3-річної загальної виживаності хворих на РПК I-III стадій залежно від: А) активності НАДФ-Н-оксидази тромбоцитів через 1 міс. після операції (1 –  $\leq 1,5 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв; 2 –  $> 1,5 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв.); Б) залежно від активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів після 18-20 сеансу ПТ (1 –  $\leq 0,31 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв; 2 –  $> 0,31 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв)

Серед показників СР-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів прогностично значимим був показник після останньої фракції ПТ по відношенню до 3-річної безрецидивної виживаності хворих на РПК. Зокрема, середнє значення активності НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів після 18-20 сеансу ПТ у хворих, які пережили 3-річний період без рецидивів, становило  $0,23 \pm 0,02 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв; у яких виникли локорегіонарні рецидиви –  $0,41 \pm 0,03 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв ( $p < 0,001$ ), а за наявності віддалених метастазів –  $0,53 \pm 0,04 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв ( $p < 0,001$ ). За допомогою ROC-аналізу визначено, що у хворих з рівнем

генерування СР після 18-20 сеансу  $>0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв 3-річна безрецидивна виживаність становила 40,0% з медіаною 23,2 міс., тоді як у хворих з низьким рівнем активності ферменту ( $<0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв) безрецидивна виживаність була 70,9%, медіана виживаності не досягнута ( $\chi^2=4,52$ ;  $p=0,026$ ; 95 % ДІ 0,21-1,05) (рис. 4 Б).

Таким чином, **показники** активності НАДФ-Н-оксидази тромбоцитів  $>1,50$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв через 1 міс. після операції та нейтрофілів після 18-20 сеансу ПТ  $>0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв у хворих на РПК можна використовувати в якості позапухлинних факторів негативного прогнозу перебігу захворювання.

**Особливості експресії Ki-67, Вах, Анг-2, iNOS в пухлинах у хворих на РПК.** З метою визначення молекулярного профілю РПК, який формується під впливом багатьох факторів, у тому числі редокс-залежних складових, що детермінують інтенсивність процесів неоангіогенезу, проліферативний, інвазивний та метастатичний потенціал пухлини, а також для уточнення механізмів дії радіомодифікації із застосуванням L-аргініну гідрохлориду, нами з'ясовано топографічні та кількісні особливості експресії маркерів Ki-67, Вах, Анг-2, iNOS в пухлині і ППСОК у 115 хворих на РПК до лікування та на фоні застосування різних схем НПТ/НХПТ.

Рівень експресії Анг-2 у паренхімі РПК в середньому у 2,4 рази перевищував такий в ППСОК ( $p=0,0074$ ) (табл. 9). У пухлинах із низьким ступенем диференціювання рівень експресії Анг-2 був вищим ( $65,64\pm 5,31$  ум. од.) порівняно з таким у високодиференційованих ( $37,79\pm 1,89$  ум. од.) та помірнодиференційованих РПК ( $55,64\pm 16$  ум. од.) ( $r=-61,3$ ;  $p=0,044$ ). Достовірне зростання рівня експресії Анг-2 зареєстровано при метастатичному ураженні лімфатичних вузлів:  $64,21\pm 7,31$  ум. од. при наявності регіонарних метастазів проти  $44,18\pm 5,07$  ум. од. за їх відсутності ( $p=0,031$ ). Встановлений прямий кореляційний зв'язок між рівнем генерування NO в пухлині до лікування та рівнем експресії Анг-2 ( $r=0,52$ ;  $p=0,003$ ) свідчить про високу NO-генеруючу активність РПК, що опосередковано індукує неоангіогенез у пухлинній тканині. Натомість достовірного зв'язку між СР-генеруючою активністю та рівнем експресії Анг-2 не було виявлено.

Таблиця 9

**Рівень експресії молекулярних маркерів у ППСОК, біоптатах пухлин до лікування і в операційному матеріалі хворих на РПК після НПТ/НХПТ**

Маркер	Рівень експресії маркера (ум. од.)				
	До лікування в ППСОК (M±m)	До лікування в пухлині (M±m) / min-max	В операційному матеріалі хворих, група (M±m)		
			II	III	IV
Анг-2	22,54±1,62	54,56±5,22 / 20,10-87,6	25,41±2,64	23,06±3,11	19,54±3,37
Вах	35,43±2,02	32,44±3,89 / 11,45-65,70	54,12±5,23	57,65±4,42	71,65±6,04
Ki-67	33,2±2,61	49,28±3,65 / 21,95-89,45	35,84±4,17	31,77±3,72	23,41±4,43
iNOS	11,08±3,14	49,22±3,74 / 12,48-88,41	24,38±3,16	38,31±4,55	45,38±5,87

Через 4-6 тижнів після НПТ/НХПТ рівень експресії Анг-2 в пухлині хворих II-IV груп значно зменшувався (табл. 9) і був обернено пропорційним до ступеня лікувального патоморфозу ( $r=-0,72$ ;  $p=0,013$ ). Рівень експресії Анг-2 у хворих IV групи був нижчим, ніж такий в II-й та III-й групах, як в цілому, так і в підгрупах з аналогічним ступенем лікувального патоморфозу (на 7-13 %), проте різниця виявилась статистично-недостовірною. Натомість достовірного зв'язку експресії Анг-2 з іншими клініко-морфологічними характеристиками хворих на РПК (стать, вік, глибина інвазії, розміри пухлини і стенозування кишки) не виявлено.

У хворих на РПК виявлено зв'язок між рівнем експресії Анг-2 та безрецидивною 3-річною виживаністю. Так, у підгрупі пацієнтів з рівнем експресії Анг-2 до лікування нижче медіани ( $\leq 51,0$  ум. од.) виживаність пацієнтів була  $75,4 \pm 7,2$  % проти  $52,9 \pm 7,4$  % у хворих з високим рівнем експресії Анг-2 ( $> 51,0$  ум. од.) ( $\chi^2=4,305$ ;  $p=0,039$ ). При розподілі хворих на групи згідно схеми лікування високий рівень експресії Анг-2 виявився прогностично-несприятливим в I ( $p=0,021$ ) та III групах хворих ( $p=0,029$ ), а у II та IV – на рівні тенденції.

Рівень експресії Вах до лікування був низьким як у тканині РПК, так і в ППСОК ( $32,44 \pm 3,89$  проти  $35,43 \pm 2,02$  ум. од.,  $p=0,211$ ). Рівень експресії Вах в пухлині РПК не залежав від віку, статі хворих, стадії, розмірів, типу росту, ступеня диференціювання пухлини і наявності стенозування просвіту кишки, а також рівня генерування CP та NO в пухлині. Після НПТ/НХПТ хворих рівень експресії Вах в межах ракової стромы не змінювався, а в межах резидуальної паренхіми посилювався, при цьому у хворих IV групи він був вищим порівняно з показниками II та III груп хворих (табл. 9). Крім того, виявлено, що за високої ефективності лікування (III ступінь лікувального патоморфозу) у хворих IV групи рівень експресії Вах ( $81,3 \pm 6,4$  ум. од.) статистично-значимо перевищувала аналогічні показники у хворих II і III груп – відповідно  $62,1 \pm 6,2$  ум. од. та  $65,4 \pm 5,4$  ум. од. ( $p=0,034$ ). За умов I-II ступеня лікувального патоморфозу показники рівня експресії Вах у хворих II-IV груп достовірно не відрізнялись. Зазначене відображає суттєвий внесок активації механізмів апоптозу у зростання обсягів пошкодження пухлинних клітин при застосуванні в схемі НХПТ L-аргініну гідрохлориду. Таким чином, за умов проведення радіомодифікації пухлинно-асоційована iNOS за рахунок насичення L-аргініном генерує NO в концентрації, достатній для інтенсифікації мітохондріального шляху апоптозу, маркером якого є білок Вах (Brouwer J.M. et al., 2014; Dewson G. et al., 2012; Renault T.T. et al., 2014). Але достовірного зв'язку між рівнем експресії Вах з 3-річною виживаністю хворих та прогнозом захворювання залежно від НПТ/НХПТ не встановлено.

Середній рівень експресії Ki-67 в тканині РПК до початку лікування складав  $49,28 \pm 3,65$  ум. од. Найвищим показником був у випадках РПК з низьким ступенем диференціювання –  $62,64 \pm 4,51$  ум. од. проти  $39,01 \pm 2,94$  ум. од. у високодиференційованих пухлинах ( $r=-0,63$ ;  $p<0,001$ ) і залежав від глибини інвазії пухлини ( $r=0,46$ ;  $p=0,015$ ) та стадії захворювання ( $r=0,53$ ;  $p=0,001$ ) (табл. 9), але не корелював із віком, статтю хворих, розмірами пухлин, типом росту і наявністю стенозування просвіту кишки ( $p>0,05$ ). Виявлено достовірний прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії Ki-67 та CP-генеруючою активністю



НАДФ×Н-оксидаз у пухлинній тканині ( $r=0,49$ ;  $p=0,035$ ) та відсутність такого з NO-генеруючою активністю пухлини. Таким чином, висока базова СР-генеруюча активність НАДФ×Н-оксидаз у пухлині РПК корелює з високим рівнем проліферативної активності пухлинних клітин.

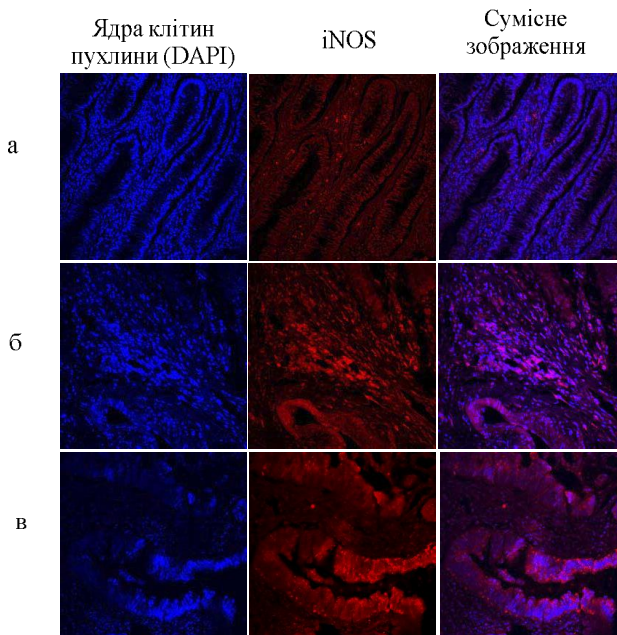
Під впливом неoad'ювантного лікування рівень експресії Ki-67 суттєво знижувався в усіх групах хворих – у середньому до  $32,45 \pm 1,19$  ум.од. ( $p < 0,001$ ) (табл. 9), обернено корелюючи зі ступенем лікувального патоморфозу ( $r = -0,72$ ;  $p = 0,011$ ). Більш виражений пошкоджуючий ефект НПТ/НХПТ на РПК в усіх групах хворих асоціювався з високою базовою експресією Ki-67, хоча достовірність такого зв'язку була притаманна хворим тільки II та III груп (відповідно  $p = 0,011$  та  $0,023$ ).

Аналіз показників виживаності всіх обстежених хворих на РПК показав, що серед пацієнтів з рівнем експресії Ki-67 до лікування нижче медіани ( $\leq 49,0$  ум. од.) безрецидивна 3-річна виживаність становила  $75,9 \pm 7,8$  %, медіана виживаності не досягалась; тоді як у хворих з високою експресією Ki-67 – безрецидивна 3-річна виживаність становила  $50,3 \pm 5,2$  % з медіаною 25,4 міс ( $\chi^2 = 4,517$ ;  $p = 0,022$ ).

Рівень експресії iNOS у пухлинах ПК становив у середньому  $49,22 \pm 3,74$  ум. од., в 4,5 рази перевищуючи такий в ППСОК ( $p < 0,001$ ) (табл. 9), при цьому експресію iNOS виявляли як в клітинах ракових залоз, так і в стромі пухлин. Сумарна інтенсивність експресії iNOS в стромальних елементах РПК, здебільшого в зонах імуноклітинних інфільтратів, перевищувала таку в клітинах пухлинної паренхіми в середньому на 24 % (відповідно  $52,53 \pm 4,37$  ум. од. проти  $42,48 \pm 3,28$  ум. од.;  $p = 0,038$ ) (рис. 5).

Рівень експресії iNOS в пухлинах хворих на РПК не корелював із віком, статтю, локалізацією, розмірами пухлини та їх ступенем диференціювання, але встановлено його зв'язок із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів ( $N_{1-2}$  –  $58,65 \pm 6,12$  ум. од.,  $N_0$  –  $41,32 \pm 5,14$  ум. од.;  $r = 0,35$ ;  $p = 0,028$ ) та високим рівнем експресії маркера при ендofітному типі росту пухлини ( $p = 0,025$ ). Зарєстровано кореляційний зв'язок між рівнем експресії iNOS та NO-генеруючою активністю в тканині РПК ( $r = 0,61$ ;  $p = 0,007$ ).

Після застосованих схем НПТ/НХПТ середній рівень експресії iNOS варіював, досягаючи найбільших показників у хворих IV групи ( $45,38 \pm 5,87$  ум. од.) порівняно з показниками II та III груп хворих (відповідно  $24,38 \pm 3,16$  ум. од. та  $38,31 \pm 4,55$  ум. од.). Проте, у стромі пухлин рівень експресії iNOS залишався без змін чи спостерігалось його зростання. Саме у стромі РПК хворих IV групи за III-IV ступеня лікувального патоморфозу і відзначалась найбільша щільність клітинних інфільтратів з iNOS-експресуючих макрофагів, лімфоцитів та лейкоцитів. Разом з тим, імунофлуоресцентне визначення експресії iNOS в пухлині виявилося менш інформативним діагностичним тестом порівняно з реєстрацією NO-генеруючої активності в пухлині шляхом спектроскопії ЕПР. Зокрема, хоча в I групі хворих рівень експресії iNOS вище медіани ( $> 52,0$  ум. од.) був пов'язаний із негативним прогнозом захворювання, проте при аналізі показників 3-річної виживаності загальної сукупності обстежених хворих на РПК за Капланом-Мейером статистично-значимого зв'язку з рівнем експресії iNOS



**Рис. 5.** Експресія iNOS у клітинах ППСОК, стромальному компоненті РПК та у пухлинних клітинах до лікування хворих: а – низький рівень експресії (поодинокі клітини) iNOS в ППСОК з локалізацією в епітелії залоз і клітинах строми; б – високий рівень експресії iNOS в клітинах лімфо-гістіоцитарного інфільтрату стромального компоненту РПК; в – виражена експресія маркера в цитоплазмі пухлинних клітин. Зб.: x200

не зареєстровано. Таке розходження пояснюється отриманими нами даними, що при аналогічному рівні експресії iNOS у різних хворих діапазон NO-генеруючої активності може коливатися в широких межах, при цьому втрата функціональної активності ферменту зареєстрована до лікування у 35 % обстежених хворих.

При аналізі рецидивів у хворих на РПК протягом 3-річного періоду спостереження встановлено його зв'язок з рівнем експресії Анг-2 та Вах. Так, у хворих з високим рівнем експресії Анг-2 ( $>51,0$  ум. од.) частіше виявляли віддалені метастази, тоді як з рівнем експресії Анг-2  $\leq 51,0$  ум. од. – локорегіонарні рецидиви. Натомість, високий рівень експресії маркера апоптозу Вах в резидуальній паренхімі РПК після курсу НПТ/НХПТ асоціюється з можливим ризиком виникнення місцевих рецидивів (табл. 10). Достовірного зв'язку характеру рецидивів РПК з рівнем експресії Ki-67 та iNOS в пухлині не встановлено.

**Залежність характеру рецидивів від  
рівня експресії Анг-2, Вах в пухлині у хворих на РПК**

Експресія маркера в пухлині до лікування (ум. од.)	Хворі з віддаленими метастазами, n (%)	Хворі з тазовими рецидивами, n (%)
Анг-2 $\leq 51,0$ (n=68/100%)	7 (10,3)	12 (17,6)
Анг-2 $> 51,0$ (n=62/100%)	17 (27,4)*	7 (11,3)*
Вах $\leq 63,5$ (n= 80/100%)	16 (20,0)	14 (17,5)
Вах $> 63,5$ (n= 50/100%)	8 (16,0)	5 (10,0)*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з парним показником

**Характеристика показників окисних модифікацій ДНК, білків і ліпідів у хворих на РПК.** Відомо, що при злоякісному процесі і особливо внаслідок впливу іонізуючого випромінювання азотисті основи ДНК піддаються вільнорадикальному окисненню CP та NO, високоінформативними маркерами якого є похідні гуаніну – 8-охоG та 8-охоdGu. Їх вміст в сечі дозволяє оцінити інтенсивність перебігу інтрацелюлярних процесів та ступінь пошкоджуючого впливу на генетичний апарат пухлини на всіх етапах її розвитку та при застосуванні антибластичних лікувальних заходів (Cooke M.S. et al., 2006, Crohns M. et al., 2009; Valavanidis A. et al., 2009).

В обстежених хворих на РПК до лікування екскреція 8-охоG та 8-охоdGu у добовій сечі складала в середньому нМ/доба·г  $1,36 \pm 0,11$  і  $2,32 \pm 0,12$  нМ/доба·г відповідно, перевищуючи показники донорів ( $0,27 \pm 0,09$  нМ/доба·г та  $0,42 \pm 0,05$  нМ/доба·г) у 5,0 та 5,5 разів (в обох випадках  $p < 0,001$ ). Встановлено достовірне зростання інтенсивності екскреції 8-охоdGu при збільшенні глибини інвазії РПК (з  $1,88 \pm 0,21$  нМ/кг маси тіла·добу при  $T_{1-2}$  до  $2,54 \pm 0,18$  при  $T_{3-4}$ ,  $p = 0,021$ ), розміру пухлини ( $\leq 5$  см –  $1,84 \pm 0,25$  нМ/кг маси тіла·добу,  $> 5$  см –  $2,51 \pm 0,17$  нМ/кг маси тіла·добу,  $p = 0,030$ ) та наявності стенозування пухлиною кишки ( $p = 0,035$ ); 8-охоG – при збільшенні глибини інвазії (з  $1,05 \pm 0,18$  нМ/кг маси тіла·добу при  $T_{1-2}$  до  $1,57 \pm 0,17$  – при  $T_{3-4}$ ,  $p = 0,049$ ), у випадках низького ступеня диференціювання пухлин (з  $1,36 \pm 0,14$  нМ/доба·г при  $G_{1-2}$  до  $1,91 \pm 0,30$  нМ/доба·г при  $G_3$ ,  $p = 0,041$ ) та зворотній характер залежності – при метастатичному ураженні регіонарних лімфатичних вузлів ( $N_0$  –  $1,57 \pm 0,17$  нМ/кг маси тіла·добу,  $N_{1-2}$  –  $1,03 \pm 0,17$ ,  $p = 0,028$ ).

Незважаючи на дещо різну динаміку при порівнянні абсолютних рівнів екскреції 8-охоG з сечею у хворих II, III, IV груп в аналогічні терміни дослідження, нами не виявлено статистично-значимої різниці показників і відмічено їх зростання по відношенню до таких перед початком лікування (табл. 11). Вихідний рівень 8-охоG в сечі пацієнтів, у яких ефективність ПТ виявилась високою (III-IV ступені патоморфозу), був суттєво нижчим, ніж у хворих, пухлини яких були резистентними до опромінення ( $r = -0,68$ ;  $p = 0,037$ ), незалежно від схеми неoad'ювантної терапії.

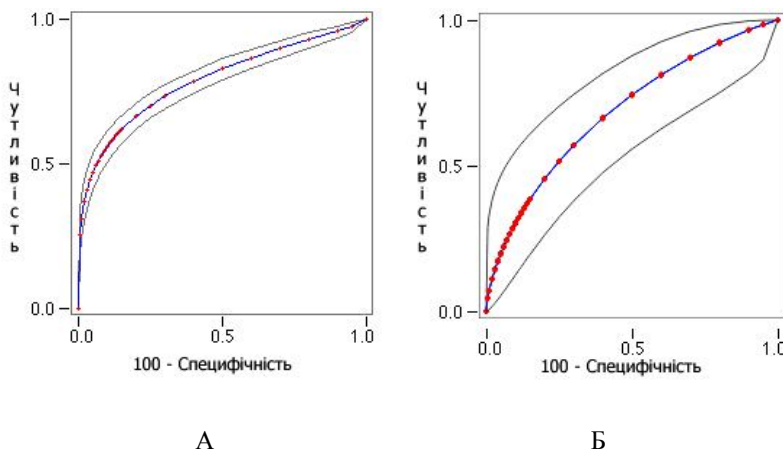
Таблиця 11

**Рівень екскреції 8-охоG (нМ/кг маси тіла·добу) під час та після ПТ у хворих із різним ступенем лікувального патоморфозу РПК**

Ступінь лікувального патоморфозу РПК	Базовий рівень до лікування	Через 1 добу після I сеансу ПТ	Через 18-20 сеансів ПТ	Через 4-6 тижнів після ПТ	Відношення показника рівня 8-охоG через 1 добу після початку ПТ до показника базового рівня
I	1,81±0,27	1,60±0,26	1,96±0,25	2,45±0,39	0,88
II	1,85±0,21	2,16±0,18	2,41±0,14*	2,52±0,17*	1,17
III	0,80±0,11	2,00±0,14*	2,53±0,23*	1,41±0,19*	2,50
IV	0,52±0,17	1,89±0,26*	2,78±0,34*	1,22±0,24*	3,63

Примітка. \* – достовірність різниці у порівнянні з даними до лікування,  $p < 0,05$

За допомогою ROC-аналізу визначено пороговий рівень екскреції 8-охоG з сечею до лікування, за умов перевищення якого прогнозується низька безпосередня ефективність НПТ/НХПТ (I-II ступені патоморфозу) – 0,56 нМ/доба·г. Розрахована площа під ROC-кривою становить 0,691 (середня якість моделі), чутливість тесту 63,4 %, специфічність – 58,5 % (рис. 6 А). Дискримінантний рівень зростання екскреції 8-охоG упродовж доби після першої фракції ПТ, який визначає прогноз ефективності променевого лікування, склав 50 %, при його перевищенні слід прогнозувати високу ефективність лікування (площа під ROC-кривою – 0,611 (середня якість моделі) чутливість тесту 59,4 %, специфічність – 56,0 %) (рис. 6 Б).



**Рис. 6.** ROC-криві визначення ефективності ПТ в залежності від вихідного рівня екскреції 8-охоG з сечею у хворих на РПК (А) та динаміки її приросту упродовж доби після першої фракції ПТ (Б) (вказано 95% - довірчий інтервал)

Разом з тим, статистично-достовірного зв'язку показників екскреції іншого похідного гуаніну – 8-oxodGu до- і на етапах комбінованого лікування хворих на РПК зі ступенем лікувального патоморфозу не було встановлено, що, очевидно, пов'язано з високою неспецифічною лабільністю маркера у відповідь на дію НПТ/НХПТ.

Для визначення інтенсивності ПОЛ, що обумовлює зміни у функціональних процесах на клітинному та тканинному рівнях, були досліджені первинні (ДК ненасичених жирних кислот) і вторинні (МДА) продукти ПОЛ у сироватці периферичної крові хворих на РПК та їх зв'язок із клініко-морфологічними характеристиками пухлинного процесу. Зокрема, зареєстроване достовірне підвищення середнього рівня ДК порівняно з показником умовно-здорових донорів в 1,64 раз (відповідно  $0,61 \pm 0,04$  ум. од. проти  $0,37 \pm 0,03$  ум. од.,  $p=0,001$ ) та МДА – в 0,73 раз (відповідно  $4,25 \pm 0,33$  мкмоль/л проти  $3,12 \pm 0,27$  мкмоль/л,  $p=0,037$ ). Встановлено кореляційний зв'язок між розмірами пухлини та активністю процесів ПОЛ у хворих на РПК: у хворих з пухлинами  $>5$  см встановлено підвищення концентрації в крові як ДК ( $0,79 \pm 0,05$  ум. од. проти  $0,44 \pm 0,04$  ум. од. при розмірі пухлини  $<5$  см,  $p=0,013$ ), так і МДА ( $5,09 \pm 0,32$  мкмоль/л проти  $4,64 \pm 0,32$  мкмоль/л,  $p=0,037$ ). Окрім того, встановлено підвищення концентрації ДК у периферичній крові за наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних колекторів ( $N_0 - 0,49 \pm 0,03$  ум.од.,  $N_{1-2} - 0,78 \pm 0,05$  ум.од.,  $p=0,015$ ). Рівень МДА у хворих віком  $>60$  років достовірно перевищував такий у хворих віком  $\leq 60$  років (відповідно  $5,99 \pm 0,45$  мкмоль/л проти  $3,11 \pm 0,33$  мкмоль/л,  $p=0,016$ ).

Нами встановлено, що неoad'ювантна терапія суттєво збільшувала інтенсивність ПОЛ у хворих на РПК II-IV груп. Рівні ДК (до лікування в II групі хворих –  $0,66 \pm 0,05$ ; III –  $0,58 \pm 0,06$ ; IV –  $0,60 \pm 0,05$  ум. од.) та МДА (до лікування в II групі хворих –  $4,21 \pm 0,39$ ; III –  $4,32 \pm 0,38$ ; IV –  $4,27 \pm 0,36$  мкмоль/л) в крові хворих усіх трьох груп достовірно зростали відповідно після I-го (на 31,8-44,8 %) та 18-20-го сеансів ПТ (на 28,1-39,5 %), залишаючись підвищеними упродовж усього періоду до операції. Різниця показників ДК і МДА при порівнянні їх серед хворих II-IV груп, як до лікування, так і під час НПТ/НХПТ була несуттєвою ( $p>0,05$ ), лише на етапі перед операцією виявлено різницю рівнів МДА у хворих IV групи порівняно з II та III: відповідно  $4,05 \pm 0,47$  мкмоль/л проти  $5,08 \pm 0,41$  ( $p=0,045$ ) та  $5,15 \pm 0,43$  мкмоль/л ( $p=0,038$ ).

Нами не виявлено статистично-значимого зв'язку концентрації ДК у сироватці крові, яку визначали на етапах неoad'ювантної терапії хворих на РПК, зі ступенем лікувального патоморфозу. Натомість, аналізуючи динаміку змін показників МДА у хворих без урахування їх розподілу на групи, встановлено, що у пацієнтів з IV та III ступенями лікувального патоморфозу пухлин на етапі перед операцією рівень МДА в крові достовірно нижчий, ніж у хворих з II та I ступенями (табл. 12). Це, очевидно, є наслідком більшої частоти випадків часткової і повної регресії новоутворень, при яких розміри пухлини і явища стенозування зменшуються.

**Рівень МДА (мкмоль/л) у хворих із різним ступенем лікувального патоморфозу РПК до і під час неoad'ювантного лікування**

Ступінь лікувального патоморфозу РПК	Базовий рівень до лікування	Через 1 добу після I сеансу ПТ	Через 18-20 сеансів ПТ	Через 4-6 тижнів після ПТ	Відношення показника рівня МДА через 1 добу після початку ПТ до показника базового рівня
I	4,23±0,45	4,33±0,56	5,66±0,55	7,11±0,69	1,02
II	4,31±0,39	4,25±0,38	5,51±0,41	6,93±0,47	0,99
III	4,19±0,50	4,30±0,44	5,73±0,53	4,49±0,49*	1,03
IV	4,26±0,44	4,24±0,46	5,69±0,48	3,92±0,54*	0,99

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з показниками при I та II ступенях патоморфозу РПК

Відомо, що високий вміст МДА в біологічних тканинах пов'язаний з інтенсивністю генерування РФК та РФА і має здатність збільшувати мітохондріальну дисфункцію ракових клітин (Lu X.F. et al., 2010). Проте, встановлена нами відсутність значимого підвищення показників МДА у хворих на фоні застосування радіомодифікації з L-аргініну гідрохлоридом, порівняно з II та III групами, вказує на наявність інших механізмів потенціювання цитотоксичної дії НХПТ шляхом застосування препарату-попередника біосинтезу NO.

Таким чином, концентрація продуктів ПОЛ в сироватці крові дозволяє оцінити рівень вже реалізованого пошкоджуючого впливу НПТ/НХПТ на пухлину, проте не дає можливість прогнозувати її ефективність. З іншого боку, результати дослідження динаміки змін ДК і МДА, які є загальноприйнятими маркерами інтоксикаційного синдрому, свідчать про відсутність значимого побічного токсичного впливу запропонованої методики радіомодифікації у хворих на РПК IV групи порівняно з іншими.

Процес окисних модифікацій білків (ОМБ) є одними із ключових механізмів інактивації ферментів і змін структурної організації білків біологічних мембран в умовах оксидативного стресу (Davies M.J. et al., 2003, Дубинина Е.Е., 2006, Rahmanto A.S. et al., 2010). Достовірної різниці показників ОМБ у хворих II-IV груп до лікування не було виявлено. Порівняно з умовно-здоровими донорами у хворих на РПК рівень продуктів ОМБ в крові був підвищений ( $p=0,001-0,006$ ) при різних довжинах світлових хвиль ( $\lambda=356, 370, 430$  нм), окрім  $\lambda=530$  нм ( $p=0,346$ ). Характерним для хворих на РПК є відносне переважання первинних (альдегідних) форм продуктів ОМБ, які перевищували показник донорів у 1,4-1,5 раз, порівняно з кетон-динітрофенілгідразонами, рівень яких був більшим за контрольний в 1,1-1,3 раз. Встановлено підвищення концентрації карбонільних похідних у крові пацієнтів на РПК віком  $> 60$  років ( $p=0,0003-0,002$ ), окрім кетон-динітрофенілгідразонів при  $\lambda=530$  нм. При розмірах пухлини більше 5 см екстинція нейтральних кетон- і альдегід-динітрофенілгідразонів зростала в 1,3

раз (відповідно при  $\lambda=356$  і  $370$  нм), а кислих альдегід-динітрофенілгідразонів – у 1,4 раз (при  $\lambda=430$  нм) порівняно з такими у пухлинах менших розмірів ( $p=0,0002-0,0013$ ).

Упродовж перших сеансів НПТ/НХПТ, включно до 7-8-го, у крові пацієнтів П-IV груп відмічено динаміку росту альдегід-динітрофенілгідразонів, які вважають маркерами фрагментації білків (Губський Ю.И. и соавт., 2005). В другій половині курсу ПТ подальший ріст екстинції 2,4-динітрофенілгідразонів відбувався в основному за рахунок кетон-динітрофенілгідразонів, які є маркерами агрегації білків на пізніх етапах окислювальної деструкції білкових макромолекул (Губський Ю.И. и соавт., 2005). У хворих IV групи абсолютні значення маркерів ОМБ у відповідні терміни НПТ/НХПТ перевищували показники II та III груп ( $p<0,05$ ). Перед операцією рівень альдегід- та кетон-динітрофенілгідразонів у крові хворих всіх груп знижувався, перевищуючи при цьому відповідні показники до лікування. На цьому етапі значимої різниці екстинції карбонільних похідних у хворих IV групи порівняно з хворими II і III груп нами не виявлено ( $p>0,05$ ). Відносне зростання екстинції карбонільних похідних у хворих IV групи під час лікування можна трактувати як наслідок інтенсифікації окисних модифікацій білкових структур пухлини під впливом опромінення на фоні зростаючої концентрації реактивних похідних NO. Разом з цим слід врахувати, що L-аргініну гідрохлорид, який вводили хворим в якості компонента радіомодифікації, поряд з проліном, лізином та треоніном є одним із основних донаторів амінокислотних залишків, з яких утворюються карбонільові похідні в ході карбонільовання аргініну (Муравлева Л.Е., 2010). Статистично-значимого зв'язку показників екстинції карбонільних похідних у сироватці крові хворих на РПК до лікування зі ступенем лікувального патоморфозу не встановлено.

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що НПТ/НХПТ у хворих на РПК окрім безпосереднього антибластомного впливу на пухлину супроводжується розвитком локального та системного оксидативного стресу із вторинним ураженням макромолекулярних структур. Характер виявлених нами біохімічних порушень відображають особливості механізмів та ступінь протипухлинного впливу НПТ/НХПТ і, з іншого боку, можуть лежати в основі проявів токсичності терапії, що свідчить про їх безпосередній внесок у формування клінічної симптоматики і необхідність у ряді випадків вибору патогенетично-обґрунтованих медикаментозних засобів для їх корекції.

**Безпосередні та віддалені результати лікування хворих на РПК.** Аналіз безпосередніх результатів доопераційної терапії хворих на РПК показав, що НПТ та НХПТ окрім місцевих побічних ефектів, спричиняють розвиток системних небажаних явищ. Зокрема, променеві цистити I-II ступенів важкості в залежності від схеми доопераційної терапії спостерігали у 15,3-16,7 % хворих без достовірної різниці між показниками різних груп. Аналогічно не виявлено різниці стосовно частоти та тяжкості променевих ректитів (43,2-46,9 %) та дерматитів (39,6-43,8 %). Гастроінтестинальні прояви вдвічі частіше спостерігали у хворих III і IV груп (22,9% та 20,4 %) порівняно з пацієнтами II групи (10,8 %, відповідно

$p=0,013$  та  $0,023$ ), що можна пояснити застосуванням у них хіміотерапевтичного агенту. Натомість, на фоні щоденного застосування в комплексі радіомодифікації препарату L-аргініну гідрохлориду частота гемодинамічних розладів у вигляді гіпотензії і преколаптоїдного стану після сеансів ПТ у хворих IV групи (10,2 %) була нижчою порівняно з такими у хворих II та III груп (16,2% та 16,7 %,  $p<0,05$ ). Рівень показників гематологічної та нефротоксичності після НПТ/НХПТ у хворих II-IV груп достовірно не відрізнявся. При оцінці функціонального стану печінки за маркерами гепатоцитолізу АлАТ і АсАТ виявлено, що якщо різниця частоти підвищення рівня АсАТ серед хворих II-IV груп була недостовірною, то частота випадків гепатотоксичності згідно показника АлАТ в IV групі хворих була статистично-значимо нижчою порівняно з такою у хворих II та III груп (відповідно  $p=0,032$  та  $p=0,027$ ). Приймаючи до уваги гепатотропну дію тівортину, можна стверджувати, що його застосування дозволяє знизити гепатотоксичні ефекти НХПТ у хворих на РПК.

У пацієнтів II-IV груп, яким операцію проводили через 4-6 тижнів після НПТ/НХПТ, в ранньому післяопераційному періоді розвивались хірургічні ускладнення, відповідно, у 18,0 %, 20,8 % та 18,4 % випадків без достовірної різниці між групами.

Таким чином, включення L-аргініну гідрохлориду поряд із фторафуром у схему потенціювання НХПТ у хворих на РПК не призводило до підвищення показників токсичності і частоти післяопераційних ускладнень. Більше того, застосування L-аргініну гідрохлориду в комплексі радіомодифікації покращувало показники серцево-судинної діяльності та сприяло зниженню гепатотоксичних ефектів НХПТ.

Аналіз безпосередньої ефективності неoad'ювантної терапії за критеріями RECIST 1.1 показав (табл. 13), що лише у хворих III та IV груп не було встановлено прогресії пухлинного процесу, тоді як у хворих II групи її констатували у 2,7 %. У значній кількості хворих відзначено стабілізацію пухлинного процесу (III група – 66,7%, IV група – 55,1 %, II група – 70,3 %).

Таблиця 13

### Безпосередня ефективність НПТ/НХПТ у хворих на РПК

№	Відповідь пухлини згідно RECIST 1.1	Кількість хворих (n=208)						Всього	
		II група (n=111)		III група (n=48)		IV група (n=49)			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	Повна регресія	1	0,9*	1	2,1*	2	4,1	4	1,9
2	Часткова регресія	29	26,1*	15	31,3*	20	40,8	64	30,8
3	Стабілізація процесу	78	70,3*	32	66,7	27	55,1	137	65,9
4	Прогресування	3	2,7*	0	–	0	–	3	1,4

Примітка. \* –  $p<0,05$  порівняно з показниками IV групи

Звертає на себе увагу той факт, що найбільша кількість хворих з частковою і повною регресією пухлин була саме у хворих IV групи – 44,9 % проти 33,4 % і 27,0 % відповідно серед хворих III та II груп. Наведене демонструє більшу



ефективність лікування хворих IV групи, у яких було застосовано L-аргініну гідрохлорид.

З метою визначення впливу НПТ/НХПТ на характер оперативних втручань було проведено оцінку кількості сфінктерозберігаючих операцій у хворих на РПК з локалізацією пухлини в нижньоампулярному відділі. Зі збереженням замикального апарату ПК були прооперовані 25,8 % хворих I групи (8 із 31), 55,1 % - II групи (27 із 49), 59,1 % - III групи (13 із 22) та 70 % - IV групи (14 із 20). Отже, в IV групі хворих за рахунок кращої регресії пухлини були створені найбільш оптимальні умови для її радикального хірургічного видалення із збереженням сфінктерного апарату ПК.

Аналіз локорегіонарних рецидивів у хворих на РПК в залежності від типу операції показав, що після сфінктерозберігаючих втручань частіше формувались внутрішньокишкові рецидиви порівняно з позакишковими (8,4±1,1 % і 2,1±0,4 % відповідно,  $p=0,027$ ), після черевно-промежних ектірпацій ПК виникали позакишкові рецидиви (6,2±1,5 %) при відсутності внутрішньокишкових. Переважна більшість рецидивів після сфінктерозберігаючих операцій (87,2-92,1%) локалізувалася по лініях швів анастомозів чи в ділянці ушитої куки ПК (після обструктивних резекцій).

Залежно від схеми неoad'ювантної терапії, частота виникнення локорегіонарних рецидивів у хворих IV групи була меншою порівняно з показниками I ( $p<0,001$ ), II ( $p=0,012$ ) та III ( $p=0,037$ ) груп (табл. 14). В даній групі хворих спостерігали всього 3 випадки тазових рецидивів, з яких усі були лагеральними. Тазові рецидиви реєстрували у хворих через 19, 24 та 35 міс. спостереження. На фоні відносно низького показника локорегіонарного рецидивування (6,1 %) частка хворих, у яких виявляли віддалені метастази, була в 1,7 раз більшою – 10,2 %. Остання мала тенденцію до зниження порівняно з аналогічними показниками інших груп, проте без статистично-значимої різниці.

Таблиця 14

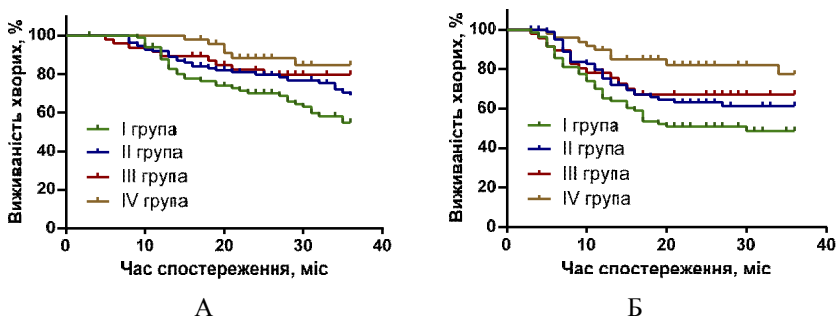
### Характеристика рецидивів у хворих на РПК після радикального лікування

Характер рецидивів	Групи хворих							
	I група (n=85)		II група (n=111)		III група (n=48)		IV група (n=49)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<b>Локорегіонарні рецидиви</b>								
1-й рік	10	11,8	4	3,6	2	4,2	0	-
2-й рік	8	9,4	6	5,4	2	4,2	1	2,0
Пізніше 2 років	5	5,9	8	7,2	3	6,3	2	4,1
Загалом	23	27,1*	18	16,2*	7	14,7*	3	6,1
<b>Віддалені метастази</b>								
1-й рік	6	7,1	4	3,6	2	4,2	0	-
2-й рік	3	3,5	6	5,4	2	4,2	3	6,1
Пізніше 2 років	3	3,5	4	3,6	3	6,3	2	4,1
Загалом	12	14,1	14	12,6	7	14,7	5	10,2

Примітка. \* –  $p<0,05$  порівняно з показниками IV групи

Потенціювання НПТ суттєво не впливало на частоту віддалених метастазів у хворих (табл. 14), проте збільшило медіану часу до їх виникнення, яка в IV групі на фоні застосування радіомодифікації склала 27,9 міс. проти 16,7 міс. ( $p=0,026$ ) у випадках лише хірургічного лікування, 15,9 міс. ( $p=0,031$ ) у хворих II групи і 18,9 міс. ( $p=0,043$ ) – у хворих III групи.

При аналізі показників 3-річної виживаності у хворих I–IV груп встановлено різні показники в залежності від характеру проведеної протипухлинної терапії до операції (рис. 7). У хворих IV групи 3-річна загальна виживаність становила  $84,8 \pm 5,3$  %, достовірно відрізняючись від показників I та II груп (відповідно:  $\chi^2=9,474$ ,  $p=0,0021$  та  $\chi^2=4,936$ ,  $p=0,026$ ). Проте, різниця порівняно з виживаністю хворих III групи виявилась недостовірною ( $\chi^2=0,759$ ,  $p=0,384$ ). Натомість 3-річна безрецидивна виживаність у хворих IV групи, яка склала  $77,4 \pm 5,5$  %, була статистично-значимо кращою порівняно з хворими I–III груп (log-rank тест при порівнянні з III групою:  $\chi^2=4,151$ ,  $p=0,042$ ).



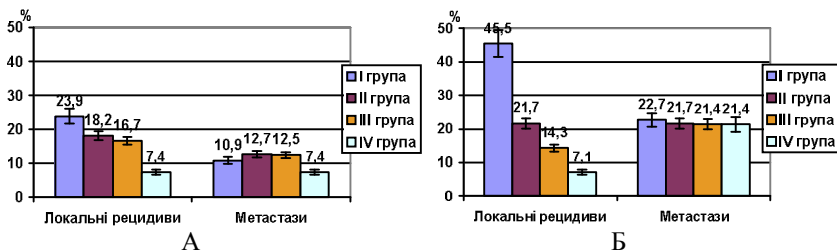
**Рис. 7.** Показники 3-річної загальної (А) та безрецидивної виживаності (Б) хворих на РПК в залежності від виду неoad'ювантної терапії. Оцінка виживаності за Капланом-Мейером, log-rank тест

Аналіз характеру і частоти рецидивування з урахуванням стадії РПК, дозволив встановити, що при локалізованих формах захворювання, коли пухлина не проростає стінку органа ( $T_2N_0M_0$ ), радіомодифікація не призводить до статистично-значимого підвищення 3-річної безрецидивної виживаності ( $83,5 \pm 7,4$  %,  $89,5 \pm 8,1$  %,  $92,2 \pm 7,2$  %,  $91,3 \pm 7,6$  % у хворих I–IV груп, відповідно; log-rank тест при порівнянні з показником IV групи:  $\chi^2=1,14-2,03$ ;  $p>0,05$ ).

У разі проростання пухлини у всі шари стінки кишки без метастатичного ураження регіонарних лімфовузлів ( $T_{3-4}N_0M_0$ ), застосування НХПТ з радіомодифікацією достовірно покращувало показники 3-річної безрецидивної виживаності хворих на РПК:  $83,4 \pm 6,1$  % у хворих IV групи проти  $59,1 \pm 5,4$  %,  $73,8 \pm 6,4$  %,  $71,5 \pm 5,2$  % у пацієнтів I–III груп відповідно (log-rank тест:  $\chi^2=4,14-4,53$ ;  $p<0,05$ ). Безрецидивна виживаність у хворих IV групи покращувалась за рахунок зниження частоти локорегіонарних рецидивів, яка виявилась у 3,2 рази меншою порівняно з такою у хворих I групи ( $p<0,001$ ) (рис. 8 А). Частота ж віддалених метастазів в залежності від виду застосованого лікування суттєво

не змінювалась, хоча у випадку застосування радіомодифікації спостерігали позитивну динаміку на рівні тенденції ( $p > 0,05$ ) (рис. 8 А).

У разі метастатичного ураження лімфатичних колекторів ( $T_{2-4}N_{1-2}M_0$ ) застосування в комплексі НХПТ радіомодифікації також сприяло покращенню показників 3-річної безрецидивної виживаності, яка становила у хворих I-IV груп відповідно  $42,1 \pm 7,4$  %,  $55,2 \pm 8,1$  %,  $60,2 \pm 7,2$  % та  $69,0 \pm 7,6$  %. Даний показник виживаності у хворих IV групи був достовірно вищим порівняно з таким у хворих I та II груп (log-rank тест:  $\chi^2 = 1,14 - 2,03$ ;  $p < 0,05$ ), що було наслідком покращення локального контролю – частота локорегіонарних рецидивів у хворих IV групи була у 6,4 разів меншою, ніж у пацієнтів, яким застосовували лише хірургічне лікування (рис. 8 Б).



**Рис. 8.** Віддалені результати лікування хворих на РПК: А) частота рецидивів і метастазів при стадії  $T_{3-4}N_0M_0$ ; Б) частота рецидивів і метастазів при стадії  $T_{2-4}N_{1-2}M_0$

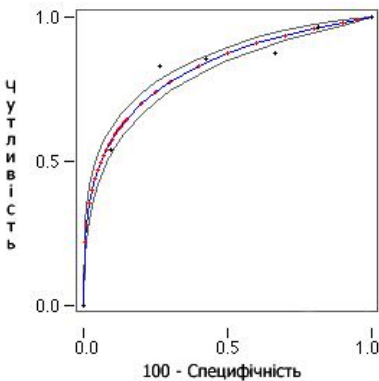
Таким чином, застосування ПТ на доопераційному етапі лікування у хворих на РПК дозволяє покращити показники локорегіонарного метастазування порівняно з такими при проведенні лише хірургічного лікування, а доповнення НПТ засобами хіміо- та радіомодифікації дозволяє досягнути подальшого покращення результатів лікування. Введення L-аргініну гідрохлориду хворим на РПК перед сеансом опромінення, очевидно, сприяє підвищенню синтезу за участю iNOS нейтрофілів та активованих макрофагів (M1) в зоні новоутворення ендogenous NO, який має здатність підвищувати чутливість пухлини до іонізуючої радіації.

**Оптимізація лікувальної тактики з урахуванням показників редокс-параметрів та пов'язаних з ними молекулярно-біологічних маркерів.** Результати наших досліджень свідчать, що ефективність відповіді РПК I-III стадій на різні схеми НПТ/НХПТ залежить від рівня редокс-показників пухлини і асоційованих з ними молекулярно-біологічних маркерів. Останні дозволяють спрогнозувати перебіг хвороби і можуть бути використані в якості додаткових критеріїв призначення неoad'ювантної чи ад'ювантної цитостатичної терапії.

Враховуючи встановлений негативний прогноз щодо виживаності хворих на РПК I-III стадій з вихідним рівнем NO-генеруючої активності iNOS  $> 2,10$  нМ/г•хв, який був статистично-значимим в I та II групах і проявлявся на рівні тенденції в III групі, пацієнтам з вказаним високим рівнем активності iNOS в

пухлинах доцільно в якості доопераційного лікування призначати курс НХПТ на фоні радіомодифікації фторафуром і тівортіном, що призводить до зростання ефективності вищевказаної схеми лікування і є позитивним предиктивним фактором.

У разі констатації на етапі обстеження хворих показника NO-генеруючої активності iNOS в пухлині  $\leq 2,10$  нМ/г, включення препарату L-аргініну гідрохлорид в схему потенціювання ПТ достовірно не впливає на результати лікування, а ефективність описаної методики радіомодифікації не перевищує показник у контрольній групі. Таким хворим для вибору оптимальної тактики на етапі до операції доцільне тестування чутливості пухлини до цитостатичної терапії шляхом визначення вихідного рівня СР-генеруючої активності в пухлині та показників екскреції продуктів окисних модифікацій ДНК в сечі. Шляхом множинної кореляції та логістичного регресійного аналізу встановлено, що предиктивна цінність комплексного визначення у хворих СР-генеруючої активності в пухлині (дискримінантний рівень для позитивного прогнозу  $>1,09$  нМ/доба·г) та рівня екскреції 8-охоG з сечею (дискримінантний рівень для позитивного прогнозу  $<0,56$  нМ/кг маси тіла·добу) на етапі до лікування сумісно з визначенням зростання рівня екскреції 8-охоG через добу після першого сеансу опромінення (дискримінантний рівень для позитивного прогнозу  $>50$  %) значно вища, ніж кожного фактора зокрема. Таким чином, запропоновано спосіб прогнозування ефективності НПТ/НХПТ у хворих на РПК, згідно якого визначають 3 вищевказані показники. За відсутності всіх сприятливих факторів прогноз ефективності ПТ є негативним, при наявності 1-2 факторів передбачають помірну ефективність лікування, а при наявності всіх трьох факторів прогнозують високу ефективність ПТ (площа під ROC-кривою – 0,851 (висока якість моделі), чутливість тесту 86,7 %, специфічність – 76,4 %) (рис. 9).



**Рис. 9.** ROC-крива прогнозування ефективності ПТ в залежності від рівня СР-генеруючої активності в пухлині та показників екскреції 8-охоG з сечею (вказано 95 %-довірчий інтервал)

У разі прогнозовано високої чутливості пухлини до застосованого лікування хворим на РПК I-III стадій доцільно продовжувати дрібнофракційну НПТ чи НХПТ до сумарної вогнищевої дози 36-40 Гр. У випадках прогнозованої низької чутливості новоутворення до НПТ/НХПТ тактика лікування повинна залежати

від ступеня резектабельності первинної пухлини. Зокрема, за наявності первинно-резектабельного РПК слід застосувати крупнофракційну ПТ за інтенсивно-концентраційною програмою сумарною вогнищевою дозою 20-25 Грей, не відкладаючи час проведення радикальної операції. З іншого боку, у випадках сумнівної резектабельності слід застосувати доопераційну поліхімотерапію.

Використання аналогічних схем АХТ в однорідних групах хворих на РПК не забезпечує однакових результатів лікування, 5-річна виживаність хворих на РПК продовжує залишатись невисокою (Bazarbashi S., 2016; Petersen S.H., 2012). Вищезазначене свідчить про необхідність впровадження нових факторів прогнозування чутливості пацієнтів до хімотерапії.

З метою з'ясування доцільності призначення АХТ у випадку констатації у хворих негативних факторів прогнозу виживаності згідно встановлених нами критеріїв, проаналізовано вплив АХТ на 3-річну загальну виживаність пацієнтів залежно від наявності факторів ризику. До уваги приймали хворих з I-II стадіями захворювання, у яких покази до застосування АХТ на сьогоднішній день остаточно не визначені (табл. 15). З іншого боку, всі хворі з III стадією РПК в межах дослідження отримували АХТ, таким чином для коректного порівняння даних неможливо було сформувати контрольну групу хворих з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів, яким після операції хімотерапію не призначали.

*Таблиця 15*

**Кількісний розподіл хворих на РПК I-II стадій із урахуванням проведення АХТ**

Лікування	Групи хворих				
	I	II	III	IV	Разом
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
<b>I стадія</b>					
Отримували АХТ	10 (58,8)	15 (45,5)	6	4	35 (51,5)
Не отримували АХТ	7 (41,2)	18 (54,5)	4	4	33 (48,5)
Всього	17 (100,0)	33 (100,0)	10	8	68 (100,0)
<b>II стадія</b>					
Отримували АХТ	27 (58,7)	34 (61,8)	14 (58,3)	16 (59,3)	91 (59,9)
Не отримували АХТ	19 (41,3)	21 (38,2)	10 (41,7)	11 (40,7)	61 (40,1)
Всього	46 (100,0)	55 (100,0)	24 (100,0)	27 (100,0)	152 (100,0)

Примітка. Курсивом виділені показники, % яких не розраховувався через незначний розмір вибірки

Встановлено статистично-значуще збільшення 3-річної загальної виживаності при застосуванні АХТ хворим з локалізованими чи місцево-поширеними формами РПК з показниками рівня експресії Анг-2 >51,0 ум. од. (p=0,026) та Ki-67 >49,0 ум. од. (p=0,018) в пухлині та СР-генеруючої активності нейтрофілів >0,31 нМ/10<sup>5</sup> кл·хв після останнього сеансу ПТ (p=0,037) (табл. 16).

Не встановлено достовірних відмінностей показників 3-річної загальної виживаності хворих на РПК при призначенні АХТ залежно від рівня СР-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидази тромбоцитів через місяць після

оперативного втручання, рівня експресії Вах та iNOS в пухлині, у тому числі при розподілі хворих на підгрупи в залежності від глибини поширення пухлинного процесу ( $p>0,05$ ).

Таблиця 16

**Показники 3-річної загальної виживаності хворих на РПК I-II стадій в залежності від рівня прогностичних маркерів та призначення АХТ**

Прогностичний маркер	Отримували АХТ		Не отримували АХТ		$\chi^2$ ; p
	Виживаність хворих, $M \pm m$ , %	Медіана виживаності, міс.	Виживаність хворих, $M \pm m$ , %	Медіана виживаності, міс.	
<b>Анг-2</b>					
$\leq 51,0$ ум. од.	92,2 $\pm$ 7,5	не досягнута	85,1 $\pm$ 6,6	не досягнута	2,359; 0,272
$> 51,0$ ум. од.	79,2 $\pm$ 6,5	не досягнута	65,4 $\pm$ 6,1	34,0	4,744; <b>0,026</b>
<b>Ki-67</b>					
$\leq 49,0$ ум. од.	93,5 $\pm$ 9,1	не досягнута	91,1 $\pm$ 7,6	не досягнута	2,629; 0,437
$> 49,0$ ум. од.	75,8 $\pm$ 5,5	не досягнута	57,3 $\pm$ 7,7	37,2	5,722; <b>0,018</b>
<b>СР-генеруюча активність НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів</b>					
$\leq 0,31$ нМ/10 <sup>5</sup> кл.хв	89,1 $\pm$ 9,4	не досягнута	83,2 $\pm$ 8,1	не досягнута	2,390; 0,254
$> 0,31$ нМ/10 <sup>5</sup> кл.хв	73,2 $\pm$ 6,7	не досягнута	58,4 $\pm$ 5,4	34,2	4,437; <b>0,037</b>

На фоні АХТ зареєстровано тенденцію до підвищення показника 3-річної загальної виживаності у хворих на РПК, як у групі хворих з низькою ( $\leq 2,10$  нМ/г·хв), так і високою NO-генеруючою активністю в пухлині.

Таким чином, сукупність даних, отриманих у результаті проведеного дослідження із залученням комплексу клінічних, морфологічних, біохімічних, біофізичних, імуофлуоресцентного методів дослідження дозволили науково обґрунтувати і запропонувати вирішення однієї з актуальних проблем онкології – оптимізації лікування хворих на РПК шляхом персоналізації лікувальної тактики з урахуванням окисно-відновного статусу пацієнтів, молекулярно-біологічного профілю пухлини та розробки нового методу радіомодифікації НХПТ хворих.

## ВИСНОВКИ

Численні дані літератури останнього 10-річчя переконливо свідчать про роль молекулярних механізмів у малігнізації і прогресії пухлинних процесів, зокрема про ключове значення основних редокс-формуєчих факторів – радикальних форм кисню та NO в регуляції проліферативних процесів злоякісного трансформованих клітин через метаболічні, пошкоджуючі і сигнальні шляхи. Протоколи комплексного лікування хворих на РПК ґрунтуються здебільшого на основних клініко-морфологічних показниках пацієнтів без урахування молекулярної гетерогенності пухлини, яка зумовлює значні відмінності у її

радіо- та хіміочутливості. Тому до пріоритетних напрямів сучасної онкології відноситься пошук нових науково-обґрунтованих підходів до персоніфікації терапевтичних схем хворих на РПК на основі оцінки параметрів окисно-відновного статусу пухлини і на системному рівні та пов'язаних з ними молекулярно-біологічних факторів.

1. Дослідження лікувального патоморфозу пухлин через 4-6 тижнів після неoad'ювантної ПТ і ХПТ хворих на РПК II-IV груп встановило у всіх пухлинах дистрофічні та некротичні зміни різного ступеня з резорбцією пухлинної паренхіми. Лікувальний патоморфоз III-IV ступенів у пухлинах визначено у 57,2% хворих IV групи після НПХТ з радіомодифікацією тегафуром та L-аргініну гідрохлоридом, тоді як у хворих II та III груп – у меншій кількості хворих, відповідно, у 25,2% та 37,5%. Характерною ознакою лікувального патоморфозу у хворих III-IV груп були значна девіталізація пухлинної паренхіми як у поверхневих, так і в глибоких зонах РПК, достовірне зменшення глікопротеїнів із одночасним масивним розростанням колагенових волокон у стромі, ознаки облітеруючої васкулопатії, значна інфільтрація стромы переважно клітинами лімфоїдного ряду та макрофагами, більша у 2-2,9 разів щільність імуноклітинних інфільтратів у глибоких відділах стінки ПК порівняно з такими у хворих, у яких радіомодифікація лікування не проводилась.

2. Встановлено, що швидкість генерування CP в тканині РПК до лікування в 4,0 рази більша порівняно з такою у ППСОК ( $p < 0,001$ ) і корелює з глибиною інвазії ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,030$ ), зростає при ендоефітному типі росту ( $p = 0,011$ ) та низькому ступені диференціювання пухлини ( $r = -0,64$ ;  $p = 0,025$ ). Інтенсивність продукції NO в пухлині більша в 9,3 разів ніж у ППСОК ( $p < 0,001$ ), корелює з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів ( $r = 0,59$ ;  $p = 0,044$ ) та є вищою при низькому ступені диференціювання пухлини ( $r = -0,61$ ;  $p = 0,034$ ). Після проведення НПТ/НХПТ рівень CP- та NO-генеруючої активності в пухлині достовірно зменшується.

Встановлено статистично-значимий зв'язок між негативним прогнозом 3-річної загальної виживаності за умов CP-генеруючої активності в пухлині  $> 1,09$  нМ/доба·г у хворих, яким не проводили неoad'ювантну терапію, та високої NO-генеруючої активності ( $> 2,10$  нМ/г·хв) у хворих, які не отримували лікування до операції чи пройшли курс НПТ без застосування радіомодифікаторів.

3. У хворих на РПК виявлено значно підвищені рівні активності НАДФ-Н-оксидази та NO-генеруючої активності iNOS тромбоцитів та нейтрофілів на всіх етапах обстеження та лікування хворих порівняно з такими в умовно-здорових донорів. Виявлено достовірний прямий кореляційний зв'язок між CP-генеруючою активністю тромбоцитів і нейтрофілів із стадією пухлинного процесу ( $r = 0,74$ ;  $r = 0,76$  відповідно) та розміром пухлини ( $r = 0,65$ ;  $r = 0,54$  відповідно). NO-генеруюча активність тромбоцитів зростає із зменшенням глибини інвазії пухлини ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ), а нейтрофілів – із зниженням ступеня диференціювання пухлини ( $r = -0,58$ ;  $p = 0,041$ ). При метастатичному ураженні лімфатичних вузлів відмічено зростання CP-генеруючої активності НАДФ-Н-оксидаз тромбоцитів ( $r = 0,67$ ,  $p = 0,045$ ) та iNOS нейтрофілів ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,019$ ).

Показник активності НАДФ-Н-оксидази тромбоцитів  $>1,50 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв через 1 міс. після операції та синтезу НАДФ-Н-оксидазою нейтрофілів периферичної крові СР після 18-20 сеансу ПТ  $>0,31 \text{ нМ}/10^5$  клітин·хв. є несприятливою прогностичною ознакою виживаності хворих на РПК після проведення комбінованого лікування.

4. Вперше проведене комплексне дослідження експресії Анг-2, Вах, Ki-67 та iNOS у пухлині хворих на РПК I-III стадій до лікування та після неoad'ювантної терапії виявило достовірне зростання рівня експресії Вах та зниження рівня експресії Анг-2, Ki-67 та iNOS в пухлинах хворих всіх досліджуваних груп після НПТ/НХПТ ( $p < 0,05$ ). Встановлено зв'язок експресії зазначених маркерів з редокс-параметрами пухлини, клініко-морфологічними показниками, рівнем лікувального патоморфозу та рецидивами захворювання. Зокрема, виявлено кореляційні зв'язки між СР-генеруючою активністю в біоптатах пухлинної тканини та рівнем експресії маркера проліферативної активності Ki-67 ( $r=0,49$ ;  $p=0,035$ ) і між інтенсивністю генерування NO та рівнем експресії маркера ангиогенезу Анг-2 ( $r=0,52$ ;  $p=0,003$ ). Швидкість генерування NO в тканині РПК до лікування хворих корелює з рівнем експресії iNOS ( $r=0,61$ ;  $p=0,007$ ), проте у 35 % хворих існує невідповідність високого рівня експресії iNOS та NO-генеруючої активності в пухлині. Рівень експресії Анг-2 та Ki-67 в пухлинах після неoad'ювантного лікування обернено корелює зі ступенем лікувального патоморфозу ( $r=-0,72$ ,  $p=0,011$  і  $r=-0,72$ ,  $p=0,013$  відповідно).

5. Перебіг РПК на фоні застосованих схем неoad'ювантної терапії супроводжується структурними та кількісними змінами макромолекулярних структур, що проявляється достовірним підвищенням рівнів маркерів окисних модифікацій ДНК – 8-охоG в сечі, ліпідів – ДК ненасичених жирних кислот і МДА, і білків – альдегід- та кетон-динітрофенілгідразонів у периферичній крові хворих. В якості предикторів чутливості пухлини до цитостатичної терапії визначено показник екскреції 8-охоG в сечі до лікування  $<0,56 \text{ нМ}/\text{доба}\cdot\text{кг}$  маси тіла та зростання його рівня через добу після початку ПТ на 50 % і більше відносно вихідного рівня.

6. Розроблено і апробовано новий спосіб радіомодифікації під час дрібнофракційної НХПТ хворих на РПК, який ґрунтується на застосуванні перорального прийому антиметаболіту фторпіримідинового ряду і системного введення L-аргініну гідрохлориду в якості субстрату для ендogenous синтезу NO. Включення L-аргініну гідрохлориду в схему потенціювання НХПТ не впливає на збільшення частоти побічних ефектів і сприяє зниженню рівня її гепатотоксичності, зокрема за рахунок зменшення інтенсивності гепатоцитолізу.

7. Позитивним предиктивним маркером ефективності радіомодифікації у хворих на РПК є вихідний рівень NO-генеруючої активності в пухлині  $>2,10 \text{ нМ}/\text{г}\cdot\text{хв}$ , за наявності якого застосування НХПТ з радіомодифікацією тегафуrom та L-аргініну гідрохлоридом супроводжується достовірним збільшенням показників 3-річної загальної та 3-річної безрецидивної виживаності, відповідно, до  $89,6 \pm 7,4 \%$  та  $82,5 \pm 9,2 \%$  проти  $74,2 \pm 7,7 \%$  та  $63,4 \pm 6,4 \%$  у хворих з такою ж активністю iNOS за умов отримання лише тегафура. У хворих із вихідним



рівнем генерування NO в пухлині  $\leq 2,10$  нМ/г·хв включення в схему лікування L-аргініну гідрохлориду не впливає на рівень лікувального патоморфозу та показники виживаності хворих.

8. Проведення НХПТ з радіомодифікацією тегафуром та L-аргініну гідрохлоридом є найбільш ефективним у порівнянні з іншими застосованими методами лікування хворих на РПК, що призводило до статистично-значимого підвищення 3-річної безрецидивної виживаності на 11,9-24,3 % (log-rank тест:  $\chi^2=4,14-4,53$ ;  $p<0,05$ ) у хворих без метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів ( $T_{3-4}N_0M_0$ ), і на 9,2 – 13,8 % (log-rank тест:  $\chi^2=1,14-2,03$ ;  $p<0,05$ ) при метастатичному ураженні лімфатичних колекторів ( $T_{2-4}N_{1-2}M_0$ ).

9. Виділено комплекс факторів окисно-відновного статусу пацієнтів та молекулярного профілю пухлини в якості додаткових критеріїв для визначення найбільш ефективного способу лікування хворих на РПК I-III стадій. До клінічно-значимих факторів негативного прогнозу віднесено NO-генеруючу активність  $>2,10$  нМ/г тканини·хв, рівень експресії Анг-2  $>51,0$  ум. од. та Ki-67  $>49,0$  ум. од. в пухлині до лікування, CP-генеруючу активність НАДФ·Н-оксидази тромбоцитів  $>1,50$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв через 1 міс. після операції та нейтрофілів периферичної крові  $>0,31$  нМ/10<sup>5</sup> клітин·хв після 18-20 сеансу ПТ. Серед цих факторів, лише зазначені показники CP-генеруючої активності нейтрофілів та рівня експресії Анг-2, Ki-67 є показанням до застосування АХТ, що призводить до статистично достовірного збільшення 3-річної загальної виживаності хворих.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для визначення рівня радіочутливості пухлини, доцільно враховувати значення швидкості генерування CP в пухлині до лікування  $>1,09$  нМоль/ г·хв, рівень добової екскреції 8-охоG з сечею до лікування  $<0,56$  нМ/доба·кг маси тіла, і зростання рівня показника 8-охоG в сечі хворого через добу після початку ПТ на 50 % і більше відносно вихідного рівня. За відсутності жодного фактору діагностують прогноз ефективності ПТ негативний, за наявності 1-2 факторів передбачають помірну ефективність лікування, за наявності всіх трьох факторів прогноують високу ефективність ПТ.

2. Рівні експресії Анг-2  $>51,0$  ум. од. та Ki-67  $>49,0$  ум. од. в пухлині до лікування, CP-генеруючу активність нейтрофілів периферичної крові  $>0,31$  нМ/10<sup>5</sup> кл·хв у хворих на РПК після останнього сеансу ПТ слід розцінювати як додаткові критерії доцільності призначення АХТ.

3. Хворим на РПК I-III стадій з рівнем NO-генеруючої активності в пухлині  $>2,10$  нМ/г хв показана НХПТ на фоні радіомодифікації, яка включає щоденний пероральний прийом антиметаболіту групи фторпіримідинів «Фторафур» і довенозні інфузії препарату L-аргініну гідрохлориду «Тівортін» перед кожним сеансом опромінення упродовж усього курсу НХПТ.

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Голотюк В.В., Крижанівська А.Є. Діагностика візуальних форм раку: навч. посібник. – Івано-Франківськ.: ДВНЗ ІФНМУ, 2014. – 215 с. (*Дисертант прийняв участь у написанні шести розділів посібника, підготовці його до друку*).
2. Голотюк В.В. Неоад'ювантна променева терапія в комбінованому лікуванні хворих на рак прямої кишки (огляд літератури) // Галицький лікарський вісник. – 2012. – Т. 19, № 4. – С. 140–143.
3. Голотюк В.В. Молекулярні маркери прогнозу колоректального раку // Галицький лікарський вісник. – 2013. – Т. 20, № 1. – С. 138–141.
4. Голотюк В.В. Оцінка лікувального патоморфозу при різних варіантах неоад'ювантної антибластомної терапії у хворих з місцево-поширеним раком прямої кишки // Галицький лікарський вісник. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 37–39.
5. Голотюк В.В. Корекція ендогенної інтоксикації в комплексному хірургічному лікуванні хворих на обструктивний рак прямої кишки // Архів клінічної медицини. – 2013. – № 1 (19). – С. 35–37.
6. Голотюк В.В. Окиснювальна трансформація макромолекулярних структур під впливом променевої терапії у хворих на рак прямої кишки // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 3, Вип. 3. – С. 92–95.
7. Голотюк В.В. Особливості розподілу і динаміки експресії маркера апоптозу Вах у хворих на рак прямої кишки під впливом неоад'ювантної хіміопроменевої терапії із застосуванням попередника оксиду азоту // Патологія. – 2015. – № 2 (34). – С. 71–74.
8. Голотюк В.В. Особливості експресії маркера неоангіогенезу Ангіопоетину-2 у тканині аденокарциноми прямої кишки під впливом неоад'ювантної хемопроевенової терапії // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т. 19, № 3 (75). – С. 38–41.
9. Голотюк В.В. Маркер мітотичної активності пухлинних клітин Ki-67 в оцінці ефективності неоад'ювантної хіміопроменевої терапії у хворих на рак прямої кишки // Вісник морфології. – 2015. – № 2. – С. 465–468.
10. Голотюк В.В. Особливості лікувального патоморфозу регіональних лімфатичних вузлів з ознаками метастатичного ураження під впливом неоад'ювантного курсу дистанційної гамма-терапії раку прямої кишки на фоні радіомодифікації // Український радіологічний журнал. – 2015. – Т. XXIII, Вип. 2. – С. 162–165.
11. Голотюк В.В., Крижанівська А.Є., Костишин І.Д. Оптимізація викладання візуальних форм раку для студентів на курсі онкології згідно вимог кредитно-модульної системи навчання // Галицький лікарський вісник. – 2010. – Т. 17, № 1. – С. 94–96. (*Дисертантом проведено підбір та аналіз наукових літературних джерел, написання та підготовку статті до друку*).
12. Голотюк В.В., Костишин І.Д. Епідеміологічні аспекти раку прямої кишки в Івано-Франківській області за 10 років // Архів клінічної медицини. – 2012. – № 2 (18). – С. 122–124. (*Автором проведено аналіз онкологічної захворюваності в регіонах області, статистичну обробку даних і підготовку статті до друку*).

13. Голотюк В.В., Юркевич Є.М., Голотюк В.І., Семенів П.М., Гончар В.Г., Ткачук Ю.Б., Партикевич Ю.Д. Інтоксикаційні індекси при комбінованому лікуванні хворих на рак прямої кишки // Архів клінічної медицини. – 2014. – № 2 (20), (Ч. 2.). – С. 31–32. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, набір клінічного матеріалу, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

14. Бурлака А.П., Ганусевич І.І., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Порушення у системі церулоплазмін-трансферин у хворих на рак прямої кишки // Онкологія. – 2014. – Т. 16, № 3 (61). – С. 206–210. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, набір клінічного матеріалу, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

15. Golotiuk V.V., Burlaka A.P. Redox-dependent Markers for Response to Neoadjuvant Radiotherapy for Rectal Cancer // The Pharma Innovation Journal. – 2014. – Vol. 3, № 6. – P. 24–27. *(Дисертантом проведено: участь у обстеженні та лікуванні пацієнтів, визначення актуальності, наукової новизни, статистична обробка отриманих даних, оформлення публікації).*

16. Golotiuk V.V., Burlaka A.P. The Influence of the Radiotherapy on the State of the Ceruloplasmin-Transferrin System and Free Iron Combinations' Levels in the Blood of Rectal Cancer Patients // The Pharma Innovation Journal. – 2014. – Vol. 3, № 7. – P. 33–37. *(Дисертантом проведено: участь у обстеженні та лікуванні пацієнтів, визначення актуальності, наукової новизни, статистична обробка отриманих даних, оформлення публікації).*

17. Голотюк В.В., Багрий М.М. Морфологические особенности сосудистых изменений в опухоли у больных раком прямой кишки, обусловленных лучевой терапией на фоне полирадиомодификации с применением антимагнетита и предшественника оксида азота // Хирургия. Восточная Европа. – 2015. – № 1 (13). – С. 26–35. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, набір клінічного матеріалу, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

18. Голотюк В.В., Попович Л.О., Доскалюк Б.В. Пектин як універсальний засіб у боротьбі з колоректальним раком // Прикарпатський вісник наукового товариства ім. Т.Г. Шевченка. – 2015. – № 4 (32). – С. 51–59. *(Дисертантом проведено підбір та аналіз наукових літературних джерел, підготовку статті до друку).*

19. Голотюк В.В. Багрий М.М., Бурлака А.П. Лікувальний патоморфоз раку прямої кишки, зумовлений променевою терапією на фоні радіомодифікації із застосуванням антимагнетита і попередника оксиду азоту // Онкологія. – 2015. – Т. 17, № 1. – С. 38–42. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, участь у обстеженні та лікуванні хворих, набір клінічного матеріалу, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

20. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Редокс-стан тромбоцитів у хворих на рак прямої кишки та його вплив на ефективність лікування // Онкологія. – 2015. – Т. 17, № 2. – С. 96–101. *(Дисертантом проведено участь у обстеженні та лікуванні хворих, набір клінічного матеріалу,*

*статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

21. Місяк С.А., Лукін С.М., Голотюк В.В., Корнієнко П.Л., Тавокін В.В., Вовк А.В., Бурлака А.П. Вплив препарату з глини “Бента” на швидкість генерування супероксидних радикалів пухлинною тканиною та нейтрофілами крові хворих на рак прямої кишки // Галицький лікарський вісник. – 2015. – Т. 22, № 2. – С. 66–68. *(Дисертантом проведено участь у обстеженні та лікуванні хворих, наборі клінічного матеріалу, формулюванні висновків, підготовці статті до друку).*

22. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Вплив O<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO-генеруючої активності нейтрофілів на ефективність неоад’ювантної променевої терапії у хворих на рак прямої кишки // Онкологія. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 253–257. *(Дисертантом проведено участь у обстеженні та лікуванні хворих, наборі клінічного матеріалу, підготовці статті до друку).*

23. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Редокс-стан крові та виживаність хворих на рак прямої кишки // Медична та клінічна хімія. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 22–28. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, участь у написанні і оформленні статті).*

24. Бурлака А.П., Ганусевич І.І., Вовк А.В., Голотюк В.В., Лукін С.М. Редоксзалежні механізми запалення в жировій тканині хворих на рак прямої кишки // Онкологія. – 2016. – Т. 18, № 3. – С. 204–209. *(Дисертантом проведено участь у обстеженні та лікуванні хворих, набір клінічного матеріалу, участь у написанні і оформленні статті).*

25. Голотюк В.В., Багрій М.М. Особливості розподілу і динаміки експресії індукцибельної синтази оксиду азоту у хворих на рак прямої кишки під впливом неоад’ювантної хіміопроменевої терапії та їх взаємозв’язок з ефективністю радіомодифікації із застосуванням препарату L-аргініну // Морфологія. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 99–103. *(Дисертантом проведено участь у обстеженні та лікуванні хворих, набір клінічного матеріалу, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

26. Burlaka A.P., Ganusevich I.I., Golotiuk V.V., Vovk A.V., Lukin S.M. Superoxide- and NO-dependent mechanisms of antitumor and antimetastatic effect of L-arginine hydrochloride and coenzyme Q10 // Experimental Oncology. – 2016. – Vol. 38, № 1. – P. 31–35. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

27. Голотюк В.В., Романчук В.Р., Доскалюк Б.В., Попович Л.О. Біологічні ефекти окисно-модифікованої ДНК і діагностичне значення молекулярних маркерів оксидної модифікації ДНК під час дії на організм агентів радіаційної природи // Буковинський медичний вісник. – 2016. – Т. 20, № 3. – С. 202–206. *(Дисертантом проведено підбір та аналіз наукових літературних джерел, підготовку статті до друку).*

28. Бурлака А.П., Ганусевич І.І., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Вірко С.В. Взаємозв’язок супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів з клінічними характеристиками хворих на рак прямої кишки та їх вплив на віддалені результати комбінованого лікування хворих // Онкологія. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 294–299. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел,*

*статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

29. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М. Маркери редокс-стану пухлин хворих на рак прямої кишки // Медична та клінічна хімія. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 39-44. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел, статистична обробка даних, участь у написанні і оформленні статті).*

30. Голотюк В.В., Петришин М.В. Особливості динаміки метаболітів окисних модифікацій білків при лікуванні хворих на рак прямої кишки // Прикарпатський вісник НТШ «Пульс». – 2016. – № 4. – С. 34-40. *(Дисертантом проведено участь у аналізі літературних джерел, обстеженні та лікуванні хворих, набір клінічного матеріалу, статистична обробка даних, участь у написанні і підготовці статті до друку).*

31. Пат. на винахід 108722 UA C2; МПК А61В 8/08, А61В 10/02. Спосіб прогнозування ефективності променевої терапії у хворих на рак прямої кишки / Голотюк В.В., Бурлака А.П., Лукін С.М., Вовк А.В. – № а201407956; заявл. 14.07.2014; опубл. 25.05.2015.- Бюл. № 10. *(Дисертант провів клінічні дослідження та аналіз їх результатів, патентний пошук, участь у оформленні патенту).*

32. Пат. на винахід 111798 UA U; МПК А61N 5/10 (2006.01), А61К 31/00, А61Р 31/00. Спосіб лікування хворих на рак прямої кишки / Голотюк В.В., Юркевич С. М., Ткачук Ю. Б., Голотюк В. І., Семенів П. М., Партикевич Ю. Д. – № а201503385; заявл. 10.04.2015; опубл. 10.06.2016. – Бюл. № 11. *(Дисертант провів клінічні дослідження та аналіз їх результатів, патентний пошук, участь у оформленні патенту).*

33. Пат. на корисну модель 102389 UA; МПК А61В 8/08, А61В 10/00, G01N 33/483. Спосіб прогнозування ефективності комбінованого лікування хворих на рак прямої кишки із врахуванням супероксид-генеруючої активності нейтрофільних гранулоцитів / Голотюк В.В., Бурлака А.П. – № а201504492; заявл. 08.05.2015; опубл. 26.10.2015. – Бюл. № 20. *(Дисертант провів клінічні дослідження та аналіз їх результатів, патентний пошук, участь у оформленні патенту).*

34. Матеріали до державної атестації випускників. Практично-орієнтований випускний екзамen з дисципліни «Хірургія»: Навчальний посібник. – Івано-Франківськ.: Видавництво ІФНМУ, 2016. – 226 с. *(Дисертант прийняв участь у підготовці матеріалу, що стосується питань онкології, підготовці його до друку).*

35. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Вовк А.В. Метод прогнозування ефективності променевої терапії у хворих на рак прямої кишки: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 200-2016. – Укрмедпатентінформ МОЗ України. – К., 2016. – 4 с.

36. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Романчук В.Р., Вівчаренко Ю.К. Спосіб радіомодифікації при лікуванні хворих на рак прямої кишки: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 204-2016. – Укрмедпатентінформ МОЗ України. – К., 2016. – 4 с.

37. Голотюк В.В. Клінічна ефективність різних способів ведення

післяопераційної рани у хворих після черевно-анальної резекції прямої кишки // *Матеріали II (63) Міжнародного конгресу студентів і молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини»*, (м. Київ, 4-6 листопада 2009 р.). – К., 2009. – С. 234–235.

38. Голотюк В.В., Крижанівська А.Є., Голотюк С.І., Костишин І.Д. Можливості підвищення ефективності комплексного лікування хворих на рак органів травної, статеві і дихальної систем // *Збірник тез доповідей обласної науково-практичної конференції «Вчені Прикарпаття – сталому розвитку краю»* (м. Івано-Франківськ, 25-26 грудня 2012 р.). – Івано-Франківськ, 2012. – С. 100–101.

39. Голотюк В.В. Ефективність застосування радіомодифікаторів і радіомодифікації у комплексі неoad'ювантної антибластомної терапії хворих на місцево-поширений рак прямої кишки // *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Пріоритети розвитку медичних наук у XXI столітті»* (м. Одеса, 18-19 квітня 2014 р.). – Одеса: ГО «Південна фундація медицини», 2014. – С. 39–42.

40. Голотюк В.В. Вплив променевої терапії на окислювальну модифікацію білків у хворих на рак прямої кишки // *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів»* (м. Львів, 25-26 квітня 2014 р.). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2014. – С. 16–18.

41. Голотюк В.В., Юркевич Є.М., Ткачук Ю.Б. Окислювальна модифікація білків в динаміці променевої терапії хворих на рак прямої кишки: *Матеріали XV конгресу СФУЛТ* (м. Чернівці, 16-18 жовтня 2014 р.) // *Українські медичні вісті*. – 2014. – Т. 11, № 1-4. – С. 310–311.

42. Голотюк В.В. Особливості розподілу і динаміки експресії маркерів проліферації Ki-67 та апоптозу Вах у хворих на рак прямої кишки під впливом неoad'ювантної хіміопроменевої терапії із застосуванням попередника оксиду азоту // *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 50-річчю кафедри патологічної анатомії та кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету «Актуальні проблеми сучасної пагоморфології та патофізіології»* (м. Запоріжжя, 28-29 травня 2015 р.). – Запоріжжя, 2015. – С. 40–41.

43. Голотюк В., Маліборська С. Сучасний метод прогнозування ефективності променевої терапії у хворих на рак прямої кишки // *Матеріали XIX міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених присвячений пам'яті ректора, члена-кореспондента НАМН України, професора Леоніда Якимовича Ковальчука* (м. Тернопіль, 27-29 квітня 2015 р.). – Тернопіль, Укрмедкнига. – С. 233.

44. Голотюк В.В., Юркевич Є.М., Голотюк В.І., Ткачук Ю.Б., Семенів П.М., Партикевич Ю.Д. Особливості змін експресії маркера Ki-67 під впливом неoad'ювантної хіміопроменевої терапії у хворих на рак прямої кишки // *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми клінічної, теоретичної, профілактичної медицини, стоматології та фармації»* (Одеса, 10-11 квітня 2015 р.). – Одеса, 2015. – С. 44–47.

45. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Семенів П.М., Юркевич Є.М., Ткачук Ю.Б., Партикевич Ю.Д. Застосування попередника оксиду азоту в програмі комплексного лікування раку прямої кишки // Тези доповідей всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 70-річчю Вінницького обласного клінічного онкологічного диспансеру «Сучасні підходи в лікуванні онкологічних хворих» (м. Вінниця, 21-22 травня 2015 р.). – Вінниця, «ТД Едельвейс і К». – 2015. – С. 124–125.

46. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Вовк А.В. Редокс-залежні розлади функціонування системи церулоплазмін/трансферин крові у хворих на рак прямої кишки // Матеріали підсумкової науково-практичної конференції “Здобутки клінічної та експериментальної медицини” присвяченої пам’яті ректора члена-кореспондента НАМН України, професора Леоніда Якимовича Ковальчука (м. Тернопіль, 17 червня 2015 р.). – Тернопіль // ТДМУ, 2015. – С. 97–98.

47. Golotiuk V., Burlaka A., Vovk A., Lukin S., Sidorik E. Evaluation of the redox state of platelets as prognostic criteria of the combined treatment in patients with rectal cancer efficacy // The 18th ECCO – 40th ESMO European Cancer Congress (Vien, 25-29 September, 2015). – abst. 2017.

48. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Вовк А.В. Прогностична цінність біомаркерів окисного пошкодження ДНК в комбінованому лікуванні хворих на рак прямої кишки // Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах» (м. Київ, 22-23 жовтня 2015 р.) // Онкологія. – 2015. – Т. 17, № 3 (65). – С. 206–207.

49. Бурлака А.П., Голотюк В.В., Вовк А.В., Лукін С.М., Сидорик Є.П. Дослідження редокс-формуючих компонентів крові хворих на рак прямої кишки та їх вплив на виживаність // Матеріали третьої міжнародної наукової конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології” (м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015 р.). – Дніпропетровськ, 2015. – С. 41–42.

50. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Юркевич Є.М., Семенів П.М., Партикевич Ю.Д., Ткачук Ю.Б. Моніторинг супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів у хворих на рак прямої кишки як додатковий маркер ефективності їх лікування // Матеріали науково-практичної конференції «Новітні методи діагностики та лікування онкологічних хворих» (м. Харків, 12-13 листопада 2015 р.). – Харків, 2015. – С. 55–56.

51. Голотюк В.В., Бурлака А.П., Вовк А.В., Романчук В.Р., Лукін С.М., Ткачук Ю.Б., Вівчаренко Ю.К. Вплив на рівні внутрішньопухлинного генерування NO при лікуванні хворих на рак прямої кишки // Матеріали XIII з’їзду онкологів та радіологів України (м. Київ, 26–28 травня 2016 р.) // Український радіологічний журнал. – 2016. – Спец. вип. 1. – С. 194.

52. Vovk A.V., Burlaka A.P., Ganusevich I.I., Golotyuk V.V., Lukin S.M. Redox mechanisms of antitumor and antimetastatic action of L-arginine hydrochloride and coenzyme Q // Materials of international scientific conference “Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer” (Kyiv, June 13–15, 2016) // Experimental Oncology. – 2016. – Vol. 38, № 2. – P. 139–140.

53. Burlaka A., Golotiuk V., Vovk A., Lukin S. Superoxide- and NO-generating

activity of neutrophils in patients with rectal cancer: effect on the effectiveness of neoadjuvant radiotherapy // Збірник тез XII міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»: (м. Львів, 19-24 квітня 2016 р). – Львів, 2016. – С. 17.

54. Голотюк В.В. Особливості експресії молекулярних маркерів пухлинного росту у хворих на рак прямої кишки під впливом неoad'ювантної хіміопроменевої терапії із застосуванням попередника оксиду азоту // Збірник матеріалів науково-практичної конференції «Прикладні аспекти морфології» (м. Тернопіль, ТДМУ, 20 – 21 жовтня 2016 р.). – Тернопіль, 2016. – С. 49–50.

55. Burlaka A., Vovk A., Lukin S., Burlaka A., Golotiuk V., Kolesnik O. EPR-monitoring of liver tissues redox state in patients with metastatic rectal cancer // X-th International Conference of European Federation of EPR Groups (Torino, 4-8 September 2016). – Torino, Italy, 2016. – P. 76.

56. Бурлака А.П., Вовк А.А., Голотюк В.В., Ганусевич І.І., Лукін С.М. Регулювання редокс-метаболізму пухлини в персоніфікації лікування раку прямої кишки // Тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю “Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції” (м. Харків, 5-7 жовтня 2016 р.). – Х.: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 50.

## АНОТАЦІЯ

**Голотюк В.В. Оптимізація окисно-відновного статусу у хворих на рак прямої кишки: молекулярні механізми ефективності комплексного лікування.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ – 2017.

У дисертації наведено нове вирішення однієї з актуальних проблем онкології – поліпшення результатів лікування хворих на рак прямої кишки (РПК) шляхом персоніфікації лікувальної тактики з урахуванням рівня основних факторів редокс-статусу пацієнтів, молекулярного профілю пухлини та розробки нового методу радіомодифікації в комплексі неoad'ювантної хіміопроменевої терапії (НХПТ).

Встановлено, що перебіг РПК супроводжується збільшенням супероксид- (СР) та NO-генеруючої активності в пухлині (відповідно в 4,0 та 9,3 разів порівняно з прилеглою слизовою оболонкою кишки,  $p < 0,05$ ) та на системному рівні, зокрема в нейтрофілах крові – відповідно в 1,5 та 4,3 рази ( $p < 0,05$ ) і тромбоцитах крові – відповідно в 10,7 та 4,1 рази ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками здорових донорів.

Виявлено зв'язок редокс-параметрів пухлини та клітин крові з основними клініко-морфологічними характеристиками хворих, ступенем лікувального патоморфозу та перебігом захворювання. Вперше встановлено, що рівень NO-генеруючої активності в пухлині  $> 2,10$  нМ/г·хв є позитивним предиктивним маркером при плануванні НХПТ з радіомодифікацією тегафуром та L-аргініном. Вперше показано, аналіз СР-генеруючої активності в пухлині до лікування та



показників екскреції 8-оксогуаніну з сечею у хворих на РПК вже через добу після першої фракції опромінення дозволяє сформувавши прогноз чутливості пухлини до променевої терапії (чутливість тесту 86,7 %, специфічність – 76,4 %).

Проведено комплексний аналіз рівня експресії маркерів Анг-2, Вах, iNOS та Ki-67 в пухлині РПК під впливом різних схем неoad'ювантної терапії та його зв'язок з редокс-показниками і клініко-морфологічними характеристиками хворих, ефективністю лікування та прогнозом перебігу захворювання.

Виділено молекулярно-біологічні маркери, пов'язані з виживаністю хворих на РПК I-III стадій, які вперше запропоновано в якості додаткових критеріїв на користь призначення ад'ювантної хіміотерапії. До них віднесено СР-генеруючу активність НАДФ-Н-оксидази нейтрофілів крові після 18-20 сеансу ПТ  $>0,31 \text{ нМ}/10^5 \text{ кл}\cdot\text{хв}$ , експресію Анг-2  $>49,0 \text{ ум. од.}$  та Ki-67  $>51,0 \text{ ум. од.}$  в пухлині до лікування.

Продемонстровано клінічну ефективність і безпечність введення хворим на РПК при НХЛТ попередника біологічного синтезу NO L-аргініну гідрохлориду в комплексі радіомодифікації та розроблено покази до його застосування.

**Ключові слова:** рак прямої кишки, окисно-відновний статус, прогностичні маркери, радіомодифікація, неoad'ювантна терапія, ад'ювантна хіміотерапія, тегафур, L-аргінін.

## АННОТАЦІЯ

**Голотюк В.В. Оптимизация окислительно-восстановительного статуса у больных раком прямой кишки: молекулярные механизмы эффективности комплексного лечения. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.07 – онкология. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев – 2017.

В диссертации приведено новое решение одной из актуальных проблем онкологии – улучшение результатов лечения больных раком прямой кишки (РПК) путем персонификации лечебной тактики с учетом уровня основных факторов редокс-статуса пациентов, молекулярного профиля опухоли и разработки нового метода радиомодификации в комплексе неoad'ювантной химиолучевой терапии (НХЛТ).

Установлено, что течение РПК сопровождается увеличением супероксид- (СР) и NO-генерирующей активности в опухоли (соответственно в 4,0 и 9,3 раз по сравнению с прилегающей слизистой оболочкой кишки,  $p < 0,05$ ) и на системном уровне, в частности в нейтрофилах крови – соответственно в 1,5 и 4,3 раз ( $p < 0,05$ ) и тромбоцитах крови – соответственно в 10,7 и 4,1 раз ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями здоровых доноров.

Выявлена связь редокс-параметров опухоли и клеток крови с основными клинико-морфологическими характеристиками и результатами лечения больных РПК. В качестве негативных факторов прогноза выживания больных РПК после комбинированного лечения предложены показатель активности НАДФ-Н-оксидазы тромбоцитов  $>1,50 \text{ нМ}/10^5 \text{ клеток}\cdot\text{мин}$  через 1 мес. после радикальной

операции и скорость синтеза СР НАДФ·Н-оксидазой нейтрофилов крови после последнего сеанса НЛТ  $>0,31 \text{ нМ}/10^5$  клеток·мин. Проведен комплексный анализ особенностей экспрессии маркеров Анг-2, Вах, iNOS и Ki-67 в опухоли РПК под влиянием различных схем неoadьювантной терапии и их связь с редокс-показателями и клинико-морфологическим характеристикам больных, эффективностью лечения и прогнозом течения заболевания.

Выделено молекулярно-биологические маркеры, связанные с выживаемостью больных РПК I-III стадий, которые впервые предложены в качестве дополнительных критериев в пользу назначения адьювантной химиотерапии. К ним отнесли СР-генерирующую активность НАДФ·Н-оксидазы нейтрофилов крови после 18-20 сеанса ЛТ  $>0,31 \text{ нМ}/10^5$  кл·мин, экспрессию Анг-2  $>49,0$  усл. ед. и Ki-67  $>51,0$  усл. ед. в опухоли до начала лечения.

Продемонстрировано клиническую эффективность и безопасность введения больным РПК при НХЛТ предшественника биологического синтеза NO L-аргинина гидрохлорида в комплексе радиомодификации и разработаны показания к его применению. Положительным предиктивным маркером эффективности радиомодификации у больных РПК является исходный уровень NO-генерирующей активности в опухоли  $>2,10 \text{ нМ}/\text{г}\cdot\text{мин}$ , в случае наличия которого применение НХЛТ с радиомодификацией тегафуром и L-аргинина гидрохлоридом сопровождается достоверным увеличением показателей 3-летней общей и безрецидивной выживаемости больных соответственно до  $89,6\pm 7,4\%$  и  $82,5\pm 9,2\%$  против  $74,2\pm 7,7\%$  и  $63,4\pm 6,4\%$  у больных с аналогичной активностью iNOS, получавших только тегафур. У больных с исходным уровнем генерации NO в опухоли  $\leq 2,10 \text{ нМ}/\text{г}\cdot\text{мин}$  включение в схему лечения L-аргинина гидрохлорида существенно не влияло на уровень лечебного патоморфоза и показатели выживаемости больных.

Определены особенности постлучевого патоморфоза РПК после перенесенной НХЛТ с радиомодификацией, которые заключаются в девитализации опухолевой паренхимы как в поверхностных, так и в глубоких зонах центральной и периферической частей опухоли, высокой плотности иммунноклеточных инфильтратов ( $8,0\text{-}9,3$  клеток/ $1000 \text{ мкм}^2$ ) и достоверном уменьшении стромальных гликопротеинов с одновременным массивным разрастанием коллагеновых волокон. Доля случаев лечебного патоморфоза III и IV степеней в опухоли и метастатически-пораженных лимфоузлах после перенесенной НХЛТ с радиомодификацией была самой высокой среди исследуемых групп, составляя  $57,1\pm 4,9\%$  против  $31,3\pm 4,8\%$  ( $p<0,05$ ) в группе больных после НХЛТ с химиорадиомодификацией фторафуром и  $25,2\pm 3,6\%$  в группе после перенесенной НЛТ ( $p<0,05$ ), при этом дополнительное повреждающее воздействие на стенку прилегающей к опухоли кишки не проявлялось.

**Ключевые слова:** рак прямой кишки, окислительно-восстановительный статус, прогностические маркеры, радиомодификация, неoadьювантная терапия, адьювантная химиотерапия, тегафур, L-аргинин.

## SUMMARY

### **Golotiuk V. Optimization of the Redox Status in Patients with Rectal Cancer: Molecular Mechanisms of Complex Treatment Efficiency.** – Manuscript.

Thesis for the Degree of Doctor of Medical Sciences, Speciality 14.01.07 – Oncology. R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv – 2017.

The dissertation put forwards a new solution to one of the pressing problems of oncology – the improvement of the results of treatment of patients with rectal cancer (RC) by dint of personalizing the therapeutic tactics and taking into account the patients' redox status main factors level, the molecular profile of the tumours and the development of a new method of radiomodification during neoadjuvant chemoradiation therapy (CRT).

It has been established that the progress of rectal cancer is accompanied by the superoxide (CP) and the NO-generating activity growth in the tumour (in 4.0 and 9.3 times respectively as compared with the mucous membrane of the intestine,  $p < 0.05$ ) and on the systemic level, particularly in neutrophils – in 1.5 and 4.3 times correspondingly ( $p < 0.05$ ); in platelets – in 10.7 and 4.1 times ( $p < 0.05$ ) when compared to the indexes of the healthy donors.

There has been revealed a bond between the redox parameters of a tumour and blood cells with the patients' main clinical and morphological characteristics, with the degree of medical pathomorphosis and the course of the disease. It was first found that the level of NO-generating activity in the tumour  $> 2.10$  nM/g·min is a positive predictive marker when slating CRT with radiomodification by tegafur and L-arginine hydrochloride. For the first time it has been shown that the analysis of CP-producing activity in a tumour before treatment and the rates of excretion of 8-oxoguanine with urine in patients with rectal cancer within one day after the first fraction of irradiation allows to predict the tumour sensitivity to radiation therapy (test sensitivity is 86.7 %, specificity – 76.4 %).

The complex analysis of Ang-2, Bax, iNOS and Ki-67 markers expression in rectal cancer tumours under the influence of different neoadjuvant therapy regimens and its connection with the redox indicators and clinical morphological characteristics of patients, treatment efficacy and prognosis of the course of the disease has been performed.

Molecular-biological markers related to the survival of rectal cancer patients of I–III stages, which are suggested for the first time as additional criteria in favour of the administration of adjuvant chemotherapy, have been identified. Among these are CP-generating activity of NADP·N-oxidase of neutrophils after 18–20 sessions of radiotherapy  $> 0.31$  nM/ $10^5$  cells/min, Ang-2 expression  $> 49.0$  standard units and Ki-67  $> 51.0$  standard units in the tumour before treatment.

There has been demonstrated clinical efficacy and safety of administration to the patients with rectal cancer undergoing CRT the precursor of biological synthesis of NO L-arginine hydrochloride in the complex of radiomodification. The indications for application have also been devised and provided.

**Key words:** rectal cancer, redox status, prognostic markers, radiomodification, neoadjuvant therapy, adjuvant chemotherapy, tegafur, L-arginine.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

iNOS – індуцибельна синтаза оксиду азоту  
L-Arg – L-аргінін  
NO – оксид азоту  
Анг-2 – ангіопоедин-2  
АХТ – ад’ювантна хіміотерапія  
Гр – Грей  
ДІ – довірчий інтервал  
ДК – дієнові кон’югати  
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота  
ЕПР – електронний парамагнітний резонанс  
КРР – колоректальний рак  
МДА – малоновий диальдегід  
МРТ – магнітно-резонансна томографія  
НПТ – неoad’ювантна променева терапія  
НХПТ – неoad’ювантна хіміо-променева терапія  
ОМБ – окисна модифікація білків  
ПК – пряма кишка  
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів  
ППСОК - прилегла до пухлини слизова оболонка кишки  
ПТ – променева терапія  
РЕА – раковий ембріональний антиген  
РПК – рак прямої кишки  
РФК – радикальні форми кисню  
РФА – радикальні форми азоту  
СКТ – скануюча комп’ютерна томографія  
СР – супероксидні радикали  
5-ФУ – 5-флуороурацил  
8-oxoG – 8-оксогуанін  
8-oxodGu – 8-гідроксо-2’-дезоксогуанозин

Підписано до друку 25.09.2017 р. Формат 60x84/16.  
Папір офсетний. Умовн. друк. арк. 1,9. Тираж 100 пр. Зам. №33  
Тираж здійснено у видавництві ДВНЗ «Івано-Франківський  
національний медичний університет».

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру  
видавців, виготовників і розповсюджувачів видавничої продукції.

ДК № 2361 від 05.12.2005 р.  
76018, м Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2