

А. П. Бурлака<sup>1</sup>, В. В. Голотюк<sup>2</sup>, А. В. Вовк<sup>1</sup>, С. М. Лукін<sup>1</sup>  
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ  
ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ<sup>1</sup>, КИЇВ  
ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ<sup>2</sup>

## МАРКЕРИ РЕДОКС-СТАНУ ПУХЛИН ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

За умов ракової хвороби редокс-стан організму і вогнищ пухлинного росту значною мірою визначається перепрограмуванням метаболізму мітохондрій та особливостями функціонування металовмісних білків, зокрема залізовмісних: лактоферину (ЛФ) і трансферину (ТФ). Окисно-індуковані модифікації генів ЛФ і ТФ призводять до порушення їх залізовв'язувальної та залізотранспортувальної функцій, що спричиняє накопичення в тканинах і крові "вільного заліза" ("ВЗ") у високій концентрації. Появу "ВЗ" у пухлинній тканині реєструють як наслідок окисно-індукованої деструкції залізовмісних гемових та негемових білків. ЛФ регулює біодоступність заліза при реалізації метаболічних функцій клітини, зокрема проліферації, маркером якої є експресія ядерного антигену Ki-67.

Метою даної роботи було дослідити рівні ЛФ, ТФ, "ВЗ" у пухлинах хворих на рак прямої кишки II та III стадій (T<sub>2-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>G<sub>2-3</sub>) і з'ясувати їх прогностичну цінність за умови проведення неoad'ювантної протипухлинної терапії.

Досліджено зразки операційного матеріалу пухлиноураженої та інтактної слизової оболонки прямої кишки (на відстані 15 см від пухлини) 67 пацієнтів (36 чоловіків і 31 жінка, середній вік – (63±1,3) року) з діагнозом аденокарциноми прямої кишки, серед яких 38 хворих мали II стадію і 29 – III стадію захворювання. Рівні ЛФ, ТФ, "ВЗ" у пухлинні визначали методом спектроскопії електронного парамагнітного резонансу за температури рідкого азоту (T=77 K). Супероксидгенеруючу активність тканин пухлини досліджували методом електронного парамагнітного резонансу з використанням технології Spin Traps. Експресію маркера проліферації Ki-67 в операційному матеріалі пухлиноураженої та інтактної прямої кишки пацієнтів з раком прямої кишки досліджували імуногістохімічним методом. Статистичний аналіз проводили за допомогою прикладної ліцензійної програми Origin 7.0. Різницю між результатами вважали достовірною при p<0,05.

Встановлено, що в помірно- та низькодиференційованих пухлинах прямої кишки вміст ЛФ, відповідно, в 15 і 50 разів вищий порівняно з інтактною слизовою оболонкою прямої кишки (p<0,05). Рівень ТФ в інтактній слизовій оболонці прямої кишки перебував у межах фізіологічної норми. Рівень "ВЗ" у низькодиференційованих аденокарциномах прямої кишки в 9 разів більший, ніж в умовно-здоровій тканині, та втричі перевищував аналогічний показник G2-пухлин (p<0,05). Швидкість генерування супероксидних радикалів в аденокарциномах з помірним та низьким ступенями диференціювання, відповідно, у 2 і 3,7 раза перевищувала значення в інтактній слизовій оболонці кишки (p<0,05). Рівень експресії Ki-67 в інтактній слизовій оболонці складав (33,2±2,61) ум. од., тоді як у G2- та G3-пухлинах він був достовірно вищим і становив, відповідно, (38,01±2,94) і (52,65±4,48) ум. од. (p<0,001). Рівень імуносигналу Ki-67 в пухлинній паренхімі корелював зі стадією пухлинного процесу, ступенем диференціювання пухлин, рівнями ЛФ та "ВЗ".

Відмічено зростання рівнів ЛФ, "ВЗ", маркера проліферації Ki-67 та швидкості генерування супероксидних радикалів в аденокарциномах прямої кишки залежно від ступеня диференціювання пухлин. Сприятливий клінічний перебіг захворювання в пацієнтів з раком прямої кишки характеризується зниженням рівнів ЛФ, "ВЗ" та експресії Ki-67, а прогресування пухлини – зростанням цих показників.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** рак прямої кишки, лактоферин, трансферин, супероксидні радикали, "вільне залізо", Ki-67.

**ВСТУП.** За умов ракової хвороби редокс-стан організму та вогнищ пухлинного росту значною мірою визначається перепрограмуванням метаболізму мітохондрій та особливостями функціонування металоферментів, зокрема залізовмісних: лактоферину (ЛФ) і трансферину (ТФ). Окисно-індуковані модифікації генів ЛФ і ТФ призводять до порушення їх залізовв'язувальної та

залізотранспортувальної функцій, що спричиняє накопичення в тканинах і крові "вільного заліза" ("ВЗ") у високій концентрації. Появу "ВЗ" у тканинах пухлини трактують як наслідок окисно-індукованої деструкції залізовмісних гемових та негемових білків. ЛФ регулює біодоступність заліза при реалізації метаболічних функцій клітини, зокрема проліферації, маркером інтенсивності якої є експресія ядерного антигену Ki-67 [1–6].

© А. П. Бурлака, В. В. Голотюк, А. В. Вовк, С. М. Лукін, 2016.

ЛФ є одним із залізовв'язувальних негемових білків сімейства трансферинів. Окрім заліза, він має здатність приєднувати Cr (III), Mn (III), Co (III) і Cu (II). За нормальних фізіологічних умов процеси поглинання заліза, його зберігання та використання є контрольованими. Поряд із цим, активнопроліферуючі пухлинні клітини потребують значної кількості заліза. Ось чому в пухлинній тканині часто реєструють підвищені рівні феритину, ЛФ, ТФ та його рецепторів [7–9].

Загально визнаним маркером клітинної проліферації є Ki-67 – негістонний білок, який міститься в ядрах і ядерцях на етапах поділу клітин. Низький рівень експресії Ki-67 спостерігають у пухлинах із сприятливим клінічним перебігом; високі значення Ki-67 виявляють у метастазуючих пухлинах та асоціюють з агресивним фенотипом колоректального раку. Підвищену експресію Ki-67 характеризують як біологічну ознаку, що сприяє розвитку місцевих рецидивів і віддалених метастазів, навіть у клінічно сприятливих випадках на ранніх стадіях розвитку злоякісних новоутворень [6, 10, 11].

Метою даної роботи було дослідити рівні ЛФ, ТФ, “ВЗ” у пухлинах хворих на рак прямої кишки II та III стадій і з'ясувати їх прогностичну цінність за умови проведення неoad'ювантної проти-пухлинної терапії.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліджено зразки операційного матеріалу пухлиноураженої та інтактної слизової оболонки прямої кишки (на відстані 15 см від пухлини) 67 пацієнтів (36 чоловіків і 31 жінка, середній вік –  $(63 \pm 1,3)$  року) з діагнозом аденокарциноми прямої кишки, серед яких 38 хворих мали II стадію ( $T_{2-4}N_0M_0G_{2-3}$ ) і 29 – III стадію захворювання ( $T_{2-4}N_{1-2}M_0G_{2-3}$ ). Хворі перебували на лікуванні в Івано-Франківському обласному клінічному онкологічному диспансері. У всіх пацієнтів діагноз, стадію захворювання і наявність метастазів верифіковано відповідно до вимог доказової медицини (в ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно).

Усі хворі отримували неoad'ювантний курс дистанційної гамма-терапії на ділянку пухлини до сумарної вогнищевої дози 38–40 Гр. Хірургічне лікування в обсязі радикальної операції проводили після 4–6-тижневої перерви.

Концентрацію ЛФ, ТФ, “ВЗ” у пухлині визначали методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) на комп'ютеризованому ЕПР-спектрометрі PE-1307 за температури рідкого азоту ( $T=77$  K) [2]. Супероксидгенеруючу активність тканин пухлини досліджували методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за кімнатної температури [3].

Імуногістохімічне визначення експресії маркера проліферації Ki-67 проводили в зрізах тканин товщиною 4  $\mu$ m з операційного матеріалу пухлиноураженої та інтактної прямої кишки пацієнтів з раком прямої кишки. Як первинні антитіла використовували анти-Ki-67 (Santa Cruz, CA, USA), як вторинні флуоресцеїновмісні антитіла – Alexa Fluor 546 Ab та Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA). Ядра клітин візуалізували за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI, 1,5 мг/мл). Імунопозитивні тканини досліджували з використанням лазерного конфокального сканувально-го мікроскопа Zeiss LSM 510 з олійно-імерсійним об'єктивом 40X/1.4NA. Кількісне визначення рівня експресії досліджуваного молекулярного маркера проводили із застосуванням медичного програмного забезпечення обробки цифрових зображень ImageJ 1.48.

Статистичний аналіз проводили за допомогою прикладної ліцензійної програми Origin 7.0. Різницю між результатами вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** На рисунку 1 наведено спектри ЕПР ЛФ та ТФ у тканинах прямої кишки онкологічних хворих. Встановлено, що в аденокарциномах прямої кишки з помірним (G2) та низьким (G3) ступенями диференціювання концентрація ЛФ становила  $(9,0 \cdot 10^{15} \pm 1,4)$  і  $(32 \cdot 10^{15} \pm 3,6)$  спінів/г сирової тканини, відповідно, в 15 та 50 разів перевищуючи вміст ТФ в інтактній слизовій оболонці прямої кишки, який складав  $(0,6 \cdot 10^{15} \pm 0,3)$  спінів/г сирової тканини ( $p < 0,05$ ).

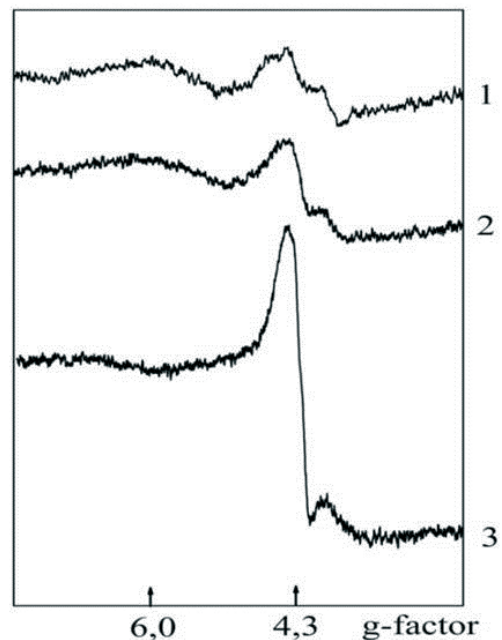


Рис. 1. Рівні трансферину (1 – інтактна слизова оболонка) та лактоферину (2 – G2-пухлини, 3 – G3-пухлини) в тканинах прямої кишки.

Зростання концентрації “ВЗ” в організмі, з урахуванням його високого прооксидантного потенціалу, може призвести до збільшення інтенсивності генерування супероксидних радикалів (СР) та мутацій ДНК [12, 13]. У злужкісних клітинах процеси, в регуляції яких задіяні СР та іони заліза, зазнають суттєвих змін, що може сприяти прогресуванню захворювання за рахунок посилення проліферації [14].

Встановлено, що в помірно- та низькодиференційованих аденокарциномах прямої кишки вміст “ВЗ” становив  $(2,8 \cdot 10^{17} \pm 1,1)$  і  $(9,4 \cdot 10^{17} \pm 2,1)$  співів/г сирій тканини відповідно (рис. 2). В інтактній слизовій оболонці кишки на відстані 15 см від пухлини цей показник не перевищував  $(1,1 \cdot 10^{17} \pm 0,7)$  співів/г сирій тканини. Таким чином, рівень “ВЗ” у низькодиференційованих аденокарциномах прямої кишки в 9 разів перевищував показник в інтактній слизовій оболонці кишки та був утричі більшим, ніж у помірнодиференційованих пухлинах ( $p < 0,05$ ).

При визначенні швидкості генерування СР у тканині прямої кишки (рис. 3) виявлено, що в аденокарциномах з помірним та низьким ступенями диференціювання даний показник становив  $(0,83 \pm 0,11)$  і  $(1,46 \pm 0,19)$  нм/г сирій тканини·хв та, відповідно, у 2 і 3,7 рази перевищував значення в інтактній слизовій оболонці кишки –  $(0,39 \pm 0,06)$  нм/г сирій тканини·хв ( $p < 0,05$ ). В G3-пухлинах рівень “ВЗ” в 1,8 рази був більшим, ніж у G2-пухлинах ( $p < 0,05$ ).

Встановлено кореляційний зв'язок між рівнями “ВЗ” та швидкістю генерування СР у цих тканинах ( $r = 0,67$ ,  $p < 0,05$ ).

У ході імуногістохімічних досліджень виявлено, що в межах інтактноі слизовоі оболонки прямої кишки експресія Ki-67 була найбільш вираженою в ділянках залозистого кишкового епітелію, тоді як у сполучнотканинній стромі відзначали мінімальний рівень імуносигналу Ki-67. У пухлинній тканині експресія Ki-67 мала виражений характер у більшості клітин атипичних залозоподібних структур. Її середній рівень складав  $(46,08 \pm 3,14)$  ум. од. проти  $(33,2 \pm 2,61)$  ум. од. в інтактній слизовій оболонці, причому в разі низького ступеня диференціювання пухлин він був достовірно більшим, ніж у помірнодиференційованих, становлячи, відповідно,  $(52,65 \pm 4,48)$  і  $(38,01 \pm 2,94)$  ум. од. ( $p < 0,001$ ), що свідчить про вищу інтенсивність проліферативних процесів у низькодиференційованих пухлинах (рис. 4). У сполучнотканинній стромі експресія Ki-67 була значно нижчою порівняно з пухлинним епітелієм, проте більш вираженою в осередках реактивних клітинних інфільтратів. Рівень імуносигналу Ki-67 в пухлинній паренхімі корелював зі стадією пухлинного процесу, ступенем дифе-

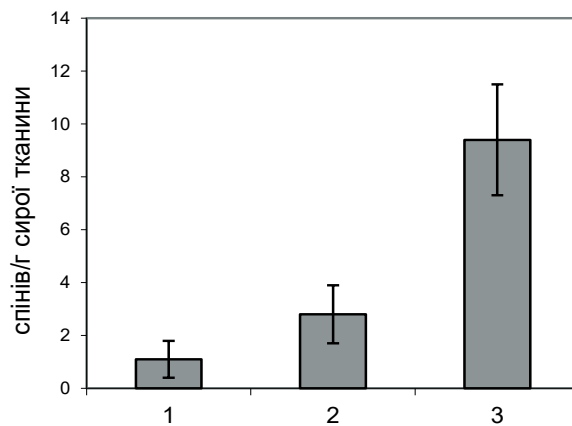


Рис. 2. Вміст “вільного заліза” у хворих на рак прямої кишки: 1 – інтактна слизова оболонка кишки; 2 – аденокарцинома G2; 3 – аденокарцинома G3.

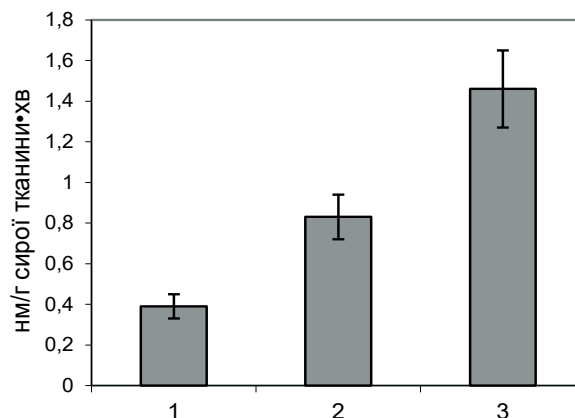


Рис. 3. Швидкість генерування супероксидних радикалів у хворих на рак прямої кишки: 1 – інтактна слизова оболонка кишки; 2 – аденокарцинома G2; 3 – аденокарцинома G3.

ренціювання пухлин, рівнями ЛФ та “ВЗ” (відповідно,  $r = 0,42$ ;  $r = 0,51$ ;  $r = 0,57$ ;  $r = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ). Новоутворенням із критерієм  $T_{2-4}$  без ознак метастазування був властивий рівень експресії Ki-67, у середньому в 1,4 рази менший, ніж у випадках  $T_{2-4}N_{1-2}M_0$ . Сприятливий клінічний перебіг захворювання в пацієнтів з раком прямої кишки характеризується зниженням рівнів лактоферину, “вільного заліза” та експресії Ki-67, а прогресування пухлини – зростанням зазначених показників [15].

**ВИСНОВКИ.** 1. Виявлено зростання рівнів лактоферину, “вільного заліза”, експресії маркера проліферації Ki-67 та швидкості генерування супероксидних радикалів в аденокарциномах прямої кишки залежно від ступеня диференціювання новоутворень.

2. Позитивна кореляція між рівнями лактоферину і “вільного заліза” – з одного боку та експресією ядерного антигену Ki-67 – з іншого ( $r = 0,57$ ;  $r = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ) свідчить про вплив показників обміну заліза на інтенсивність проліферативних процесів у пухлині.

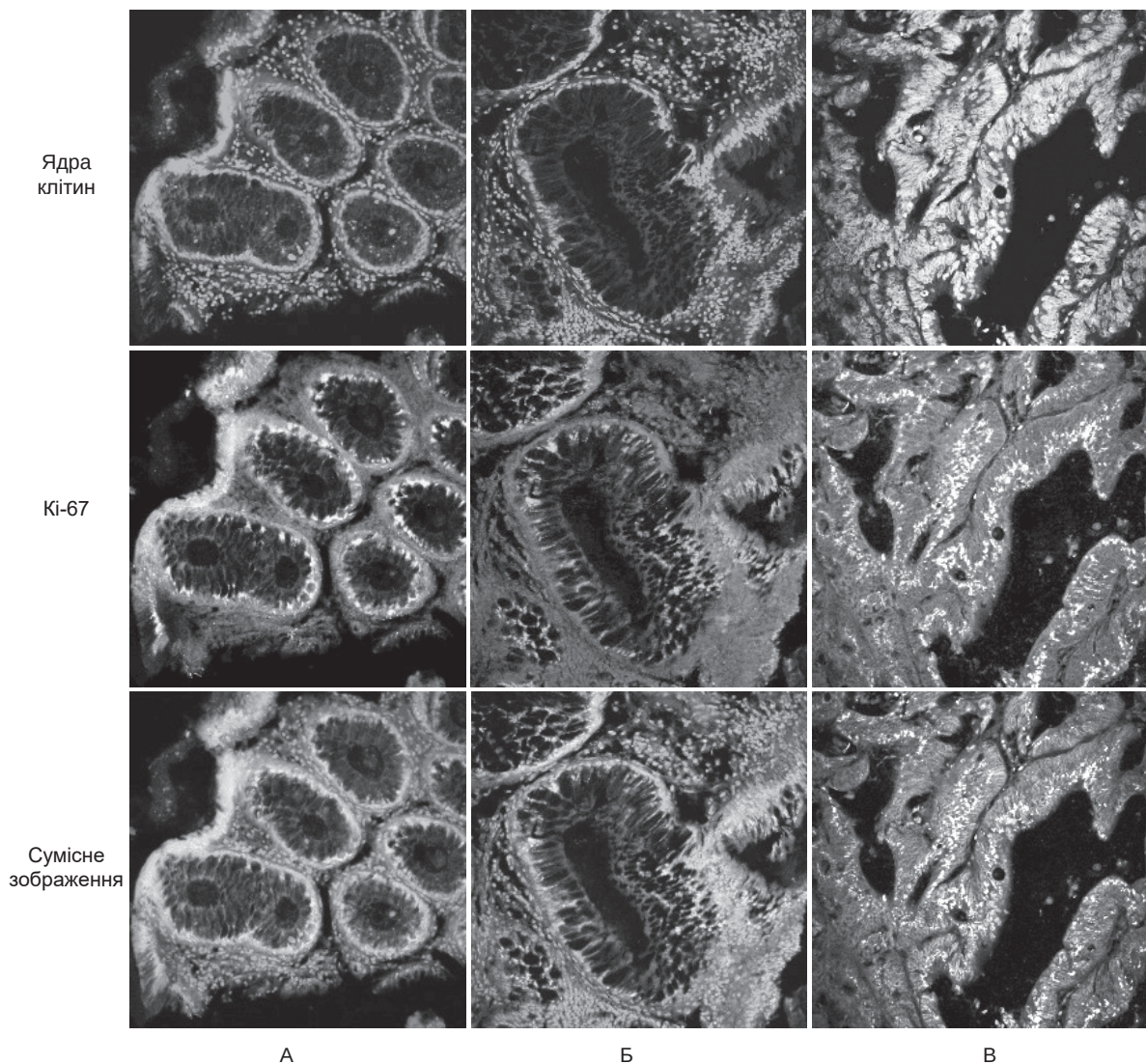


Рис. 4. Експресія Ki-67 в інтактній кишці (А), помірнодиференційованій (Б) та низькодиференційованій (В) аденокарциномах прямої кишки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака А. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик. – К. : Наукова думка, 2006. – 227 с.
2. Порушення у системі церулоплазмін-трансферин у хворих на рак прямої кишки / А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, В. В. Голотюк [та ін.] // Онкологія. – 2014. – **16**, № 3. – С. 206–210.
3. Мітохондріальний редокс-контроль матричних металопротеїнази та метастазування у хворих на рак молочної залози / А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, Є. В. Лук'янчук [та ін.] // Онкологія. – 2010. – **12**, № 4. – С. 377–382.
4. Gibbons J. A. Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer / J. A. Gibbons, J. R. Kanwar, R. K. Kanwar // BMC. Cancer. – 2015. – **15**. – P. 1–16.
5. Muñoz M. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload / M. Muñoz, J. A. García-Erce, Á. F. Remacha // J. Clin. Pathol. – 2011. – **64**. – P. 287–296.
6. Nuclear Factor Kappa B, Matrix Metalloproteinase-1, p53, and Ki-67 Expressions in the Primary Tumors and the Lymph Node Metastases of Colorectal Cancer Cases / I. Meteoglu, I. H. Erdogdu, P. Tuncyurek [et al.] // Gastroenterology Research and Practice. – 2015. – P. 945392.
7. Torti S. V. Iron and cancer: more ore to be mined / S. V. Torti, F. M. Torti // Nat. Rev. Cancer. – 2013. – **13**. – P. 342–355.
8. Bovine lactoferrin counteracts Toll-like receptor mediated activation signals in antigen presenting cells / P. Puddu, D. Latorre, M. Carollo [et al.] // PLoS ONE. – 2011. – **6**. – P. 22504.

9. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial / H. Tsuda, T. Koza, G. linuma [et al.] // *Biometals*. – 2010. – **23**. – P. 399–409.
10. Prognostic significance of Ki-67 expression in rectal carcinoid tumors / S. M. Hong, Y. S. Kim, J. S. Moon [et al.] // *Korean J. Gastroenterol.* – 2013. – **61**. – P. 82–87.
11. Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms / A. K. Kanugula, P. N. Gollavilli, S. B. Vasamsetti [et al.] // *FEBS J.* – 2014. – **281**. – P. 3719–3238.
12. Bystrom L. M. Iron and reactive oxygen species: friends or foes of cancer cells? / L. M. Bystrom, M. L. Guzman, S. Rivella // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – **20** (12). – P. 1917–1924.
13. Systemic and tumor level iron regulation in men with colorectal cancer: a case control study / C. K. Pusatcioglu, E. Nemeth, G. Fantuzzi [et al.] // *Nutr. Metab. (Lond)*. – 2014. – **11**. – P. 21.
14. Xue X. Intestinal Iron Homeostasis and Colon Tumorigenesis / X. Xue, Y. M. Shah // *Nutrients*. – 2013. – **5** (7). – P. 2333–2351.
15. Голотюк В. В. Маркер мітотичної активності пухлинних клітин Ki-67 в оцінці ефективності неоад'ювантної хіміопроменевої терапії у хворих на рак прямої кишки / В. В. Голотюк // *Вісн. морфології*. – 2015. – **2** (21). – С. 465–468.

**А. П. Бурлака<sup>1</sup>, В. В. Голотюк<sup>2</sup>, А. В. Вовк<sup>1</sup>, С. Н. Лукин<sup>1</sup>**  
 ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ  
 ИМЕНИ Р. Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ<sup>1</sup>, КИЕВ  
 ИВАНО-ФРАНКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ<sup>2</sup>

## МАРКЕРЫ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ

### Резюме

В условиях раковой болезни редокс-состояние организма и очагов опухолевого роста в значительной степени определяется перепрограммированием метаболизма митохондрий и особенностями функционирования металлосодержащих белков, в частности железосодержащих: лактоферрина (ЛФ) и трансферрина (ТФ). Окислительно-индуцированные модификации генов ЛФ и ТФ приводят к нарушению их железосвязывающей и железотранспортирующей функций, что является причиной накопления в тканях и крови “свободного железа” (“СЖ”) в высокой концентрации. Появление “СЖ” в опухолевой ткани регистрируют как следствие окислительно-индуцированной деструкции железосодержащих гемовых и негемовых белков. ЛФ регулирует биодоступность железа при реализации метаболических функций клетки, в частности пролиферации, маркером которой является экспрессия ядерного антигена Ki-67.

Целью данной работы было исследовать уровни ЛФ, ТФ, “СЖ” в опухолях больных раком прямой кишки II и III стадий ( $T_{2-4}N_{0-2}M_{0}G_{2-3}$ ) и выяснить их прогностическую ценность в условиях проведения неоад'ювантной противоопухолевой терапии.

Исследованы образцы операционного материала опухолипораженной и интактной слизистой оболочки прямой кишки (на расстоянии 15 см от опухоли) 67 пациентов (36 мужчин и 31 женщина, средний возраст –  $(63 \pm 1,3)$  лет) с диагнозом аденокарциномы прямой кишки, среди которых 38 больных имели II стадию и 29 – III стадию заболевания. Уровни ЛФ, ТФ, “СЖ” в опухоли определяли методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса при температуре жидкого азота ( $T=77$  К). Супероксид-генерирующую активность тканей опухоли исследовали методом электронного парамагнитного резонанса с использованием технологии Spin Traps. Экспрессию маркера пролиферации Ki-67 в операционном материале опухолипораженной и интактной прямой кишки пациентов с раком прямой кишки исследовали иммуногистохимическим методом. Статистический анализ проводили с помощью прикладной лицензионной программы Origin 7.0. Разницу между результатами считали достоверной при  $p < 0,05$ .

Установлено, что в умеренно- и низкодифференцированных опухолях прямой кишки содержание ЛФ, соответственно, в 15 и 50 раз выше по сравнению с интактной слизистой оболочкой прямой кишки ( $p < 0,05$ ). Уровень ТФ в интактной слизистой оболочке прямой кишки находился в пределах физиологической нормы. Уровень “СЖ” в низкодифференцированных аденокарциномах прямой кишки в 9 раз больше, чем в условно-здоровой ткани, и втрое превышал аналогичный показатель в G2-опухолях ( $p < 0,05$ ). Скорость генерации супероксидных радикалов в аденокарциномах с умеренной и низкой степенями дифференцировки, соответственно, в 2 и 3,7 раза превышала значение в интактной слизистой оболочке прямой кишки ( $p < 0,05$ ). Уровень экспрессии Ki-67 в интактной слизистой оболочке составлял  $(33,2 \pm 2,61)$  у. е., тогда как в G2- и G3-опухолях он был достоверно выше и составлял, соответственно,  $(38,01 \pm 2,94)$  и

(52,65±4,48) у. е. ( $p < 0,001$ ). Уровень иммуносигнала Ki-67 в опухолевой паренхиме коррелировал со стадией опухолевого процесса, степенью дифференцировки опухолей, уровнями ЛФ и “СЖ”.

Отмечен рост уровней ЛФ, “СЖ”, маркера пролиферации Ki-67 и скорости генерирования супероксидных радикалов в аденокарциномах прямой кишки в зависимости от степени дифференцировки опухолей. Благоприятное клиническое течение заболевания у пациентов с раком прямой кишки характеризуется снижением уровней ЛФ, “СЖ” и экспрессии Ki-67, а прогрессирование опухоли – ростом этих показателей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рак прямой кишки, лактоферрин, трансферрин, супероксидные радикалы, “свободное железо”, Ki-67.

**A. P. Burlaka<sup>1</sup>, V. V. Holotiuk<sup>2</sup>, A. V. Vovk<sup>1</sup>, S. M. Lukin<sup>1</sup>**

R. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY,  
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE<sup>1</sup>, KYIV  
IVANO-FRANKIVSK NATIONAL UNIVERSITY<sup>2</sup>

## REDOX STATE MARKERS OF TUMORS IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

### Summary

*In terms of cancer disease the redox state of a body and focuses of tumor growth is largely determined by reprogramming mitochondria metabolism and features of functioning of metal-containing proteins, in particular, iron-containing proteins: lactoferrin (LF) and transferrin (TF). Oxidation-induced modifications of genes LF and TF lead to violation of their iron-binding and iron-transporting functions, which leads to accumulation of “free iron” (“FI”) in tissues and blood in high concentrations. The appearance of “FI” is registered in tumor tissue as a result of oxidation-induced destruction of heme and non-heme iron-containing proteins. LF regulates the bioavailability of iron at the realization of metabolic functions of a cell, in particular, proliferation, which marker is the expression of nuclear antigen Ki-67. The purpose of the work was to investigate levels of LF, TF, “FI” in tumors of patients with colorectal cancer (CRC) at stages II and III ( $T_{2-4}N_{0-2}M_{0G_{2-3}}$ ) and determine their predictive value during the neoadjuvant anti-tumor therapy.*

*Surgical samples of tumor-affected and intact rectal mucosa (at a distance of 15 cm from the tumor) were studied. The samples were taken from 67 patients (36 men and 31 women, mean age – (63±1.3) years) with a diagnosis of rectal adenocarcinoma, among whom 38 patients had the II stage and 29 – the third stage of the disease. The rates of LF, TF, “FI” in a tumor were determined by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy method at the temperature of liquid nitrogen ( $T=77$  K). Superoxide-generating activity of tumor tissues was studied by EPR method using Spin Traps. Expression of the proliferation marker Ki-67 in surgical specimens of a tumor-affected and intact rectum of patients with CRC were investigated by immunohistochemical method. Statistical analysis was performed using the licensed application Origin 7.0. The difference between the results were considered significant at  $p < 0.05$ .*

*It has been revealed that in medium and low differentiated rectal tumors the content of LF was 15 and 50 times higher, respectively, compared to the intact rectal mucosa ( $p < 0.05$ ). TF level in the intact rectal mucosa was within physiological norm. ‘FI’ level in low differentiated rectal adenocarcinomas was 9 times higher than in the conditionally healthy tissue and three times higher than the ‘FI’ level of G2-tumors ( $p < 0.05$ ). The rate of generation of superoxide radicals (SR) in adenocarcinomas with medium and low differentiation was 2 and 3.7 times higher, respectively, than the rate in the intact rectal mucosa ( $p < 0.05$ ). The level of expression of Ki-67 in intact mucosa was (33.2±2.61) standart unit, while in the G2 and G3 tumors it was significantly higher, and it was (38.01±2.94) and (52.65±4.48) standart unit, respectively ( $P < 0.001$ ). The level of immunosignal of Ki-67 in the tumor parenchyma correlated with the tumor stage, degree of tumor differentiation, level of LF and “FI”.*

*It has been revealed an increase in levels of LF, “FI”, proliferation marker Ki-67 and SR generation rate in rectal adenocarcinomas, depending on the degree of differentiation of tumors. The favorable clinical course of disease in patients with CRC is characterized by reduced levels of LF, “FI” and Ki-67 expression, but the tumor progression – by an increase in these levels.*

**KEY WORDS:** rectal cancer, lactoferrin, transferrin, superoxide radicals, “free iron”, Ki-67.

Отримано 02.11.16

**Адреса для листування:** А. П. Бурлака, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. С. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, e-mail: apburlaka@gmail.com.