

А.П. Бурлака<sup>1</sup>  
 І.І. Ганусевич<sup>1</sup>  
 А.В. Вовк<sup>1</sup>  
 С.М. Лукін<sup>2</sup>  
 С.В. Вірко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

<sup>2</sup>Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак молочної залози, гормонорецепторний статус, редокс-стан крові, супероксидні радикали, оксид азоту.

## ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ РЕДОКС-СТАНУ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

**Мета:** дослідити рівень церулоплазміну (ЦП), трансферину (ТФ), NO-гемоглобіну (NO-Hb), метгемоглобіну (MetHb), супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів та матриксних металопротеїназ-2 і -9 (ММП-2 і -9) у крові хворих на рак молочної залози (РМЗ) II–III стадії з різним гормонорецепторним статусом пухлин. **Об'єкт і методи:** досліджено кров хворих на РМЗ в репродуктивному та постменопаузальному віці. Рівень ЦП, ТФ, «вільного» заліза, геміхромів, MetHb, NO-Hb та убісеміхінону досліджували методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) у низькотемпературному режимі (77 К). Швидкість генерування супероксидних радикалів (СР) нейтрофілами визначали методом ЕПР при кімнатній температурі з використанням спінового уловлювача TEMPONE-H («Sigma»). NO-генеруючу активність нейтрофілів крові оцінювали методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за температури 77 К (спіновий уловлювач — діетилдитіокарбамат). Рівень активних форм желатиназу у сироватці крові визначали методом зимографії у поліакриламідному гелі. **Результати:** у пацієток репродуктивного та постменопаузального віку з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-) статусом пухлин рівень ЦП перевищував значення, характерні для донорів, а рівень ТФ був достовірно нижчий. Вміст у крові NO-Hb був найвищим у хворих на РМЗ в постменопаузальному віці з ER(-)/PR(-) статусом пухлин та прямо корелював з NO-генеруючою активністю нейтрофілів ( $r = 0,56; p < 0,05$ ). Активність ММП-9 у сироватці крові хворих з ER(-)/PR(-) статусом новоутворення у 3,3 рази достовірно перевищувала таку у пацієток з ER(+)/PR(+). У крові 78% хворих на РМЗ постменопаузального віку з ER(-)/PR(-) виявлено підвищення вмісту метаболітів естрогенів — хінонів та убісеміхінонів, рівень останніх прямо корелював зі стадією пухлинного процесу ( $r = 0,58; p < 0,05$ ). Встановлено, що нейтрофіли в крові хворих репродуктивного віку з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-) генерують СР зі швидкістю, яка відповідно у 9 та 18 разів вища порівняно з донорами, а NO — більше ніж у 12 разів незалежно від гормонорецепторного статусу пухлин. **Висновок:** виявлено порушення редокс-стану крові у хворих на РМЗ, зміни якого залежать від гормонорецепторного статусу пухлин, зокрема ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-).

### ВСТУП

Значна кількість досліджень присвячена вивченню факторів (зокрема ролі естрогенів), які спричиняють підвищення захворюваності на рак молочної залози (РМЗ). У жінок постменопаузального віку рівень циркулюючого естрогену у сироватці крові та тканині молочної залози знижений, але частота розвитку РМЗ залишається високою, що свідчить про наявність інших чинників. На нашу думку, до останніх можна віднести здатність естрогенів та їх метаболітів порушувати рівновагу у редокс-стані в органах і крові шляхом посилення генерування супероксидних радикалів (СР), які чинять як сигнальні, так і пошкоджувальні ефекти. Разом з тим під час менопаузи в організмі жінок підвищується рівень заліза, яке накопичується в результаті припинення крововтрат і деградації залізовмісних білків [1–5]. Порушення редокс-стану, депонування і регулювання рівня заліза, яке за фізіологічних умов забезпечує проліфе-

рацію та ріст клітин, є ключовим фактором виживання клітин у мікрооточенні як пухлин, так і метастазів і може призводити до прогресування РМЗ, що дає підстави для оцінки його прогностичного значення [5, 6]. Матриксні металопротеїнази (ММП) відомі як ферменти, які в процесі пухлинної інвазії та метастазування забезпечують протеолітичне розщеплення міжклітинного матриксу та активацію низки факторів, хемокінів і рецепторів шляхом їх протеолітичного модулювання [7]. Останнім часом увага багатьох дослідників прикута до вивчення зв'язків між рівнями експресії/активності ММП та гормонорецепторним статусом пухлин хворих на РМЗ. Низка сучасних досліджень розглядає рівні желатиназу у співвідношенні з ER/PR-статусом пухлин молочної залози з метою використання цих показників у прогнозі перебігу захворювання [8, 9]. Ця стаття дасть уявлення про рівні редоксзалежних молекул і ММП у хворих на РМЗ залежно від гормонорецепторного статусу пухлин.

Метою роботи було дослідити рівень церулоплазміну (ЦП), трансферину (ТФ), NO-гемоглобіну (NO-Hb), метгемоглобіну (MetHb), супероксид-та NO-генеруючої активності нейтрофілів та ММП-2 і-9 у крові хворих на РМЗ II–III стадії з різним гормоналорцепторним статусом пухлин.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено зразки крові 40 хворих на РМЗ II–III стадії репродуктивного віку ( $33,0 \pm 6,0$  року) та 42 хворих на РМЗ постменопаузального віку ( $57,0 \pm 5,0$  року). Серед пацієнток репродуктивного віку 23 були з ER(+)/PR(+) статусом пухлин, 17 — з ER(-)/PR(-). У групі постменопаузального віку було 27 та 15 жінок відповідно з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-) статусом РМЗ. У 100% випадків пухлини молочної залози за гістологічним типом були аденокарциномами. Хворі проходили лікування в Національному інституті раку МОЗ України. Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень, викладених у Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації. Пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання клінічного матеріалу в дослідницьких цілях.

Рівень ЦП, ТФ, «вільного» заліза, геміхромів, MetHb, NO-Hb та убісеміхінону досліджували методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) у низькотемпературному режимі (77 К) [10]. Для приготування зразків використовували 0,5 мл крові з додаванням трилону Б, яку заморожували в спеціальній прес-формі при 77 К. Швидкість генерування СР нейтрофілами визначали методом ЕПР при кімнатній температурі в парамагнітно чистому кварцовому дьюарі з використанням спінового уловлювача TEMPONE-H («Sigma»). NO-генеруючу активність нейтрофілів крові оцінювали методом ЕПР з використанням технології Spin Traps за температури 77 К. Як спіновий уловлювач використовували діетилдитіокарбамат («Sigma») [11]. Нейтрофіли крові виділяли відповідно до методики [12]. У якості контролю використовували визначені за тими самими методиками показники в умовно здорових жінок ( $n = 17$ ) віком 35–63 роки. Спектри ЕПР при температурі рідкого азоту (77 К) реєстрували у парамагнітно чистому кварцовому дьюарі на комп'ютеризованому спектрометрі PE-1307 із резонатором  $H_{011}$ . Потужність джерела надвисокочастотного випромінювання становила 40 мВт, частота модуляції 100 кГц та амплітуда 10 Гс, постійна часу приймача  $\tau = 0,3$  с. Рівень досліджуваних показників представлено у відносних одиницях (відн. од.) із порівнянням зі стандартом інтенсивності, за який використовували спеціально орієнтований зразок монокристалу рубіну ( $Al_2O_3$ ) із низьким вмістом іонів  $Cr^{3+}$ . Методом подвійного інтегрування оцінювали концентрацію молекул, зіставляючи інтенсивність сигналів у спектрах ЕПР з інтенсивністю стандарту. Помилка методу інтегрування спектрів та розкид відтворення спектрів одного зразка становить не більше 3%. Рівень активних форм желатиназу у сироватці крові визначали відповідно до методу, описаного в роботі [13]. Дані представлено у вигляді середніх значень зі стандартним відхиленням ( $M \pm SE$ ). Вживаність хворих аналізува-

ли за методом Каплана — Мейера, для парних порівнянь використовували log-rank критерій [14]. Статистичний аналіз проводили із застосуванням прикладних ліцензійних програм GraphPadPrism 6 та Excel. Різницю між показниками вважали достовірною при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ЦП — білок гострої фази запалення і багатофункціональний фермент, який проявляє активність амінооксидази, супероксиддисмутази та ферооксидази. Він каталізує окиснення  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , що важливо для навантаження апо-трансферину (апо-ТФ) іонами заліза. ЦП синтезується в печінці, але може продукуватися і клітинами пухлин РМЗ. Молекула ЦП складається з шести доменів і містить шість іонів міді, три з яких утворюють триядерний кластер, а інші три — індивідуально в доменах 2, 4 і 6 [1, 15]. У крові людини методом ЕПР реєструють ЦП, що ідентифікується за інтенсивністю сигналу ЕПР з  $g = 2,05$ – $2,209$  ( $A = 155$ – $200$  Гс), який має низькоінтенсивну компоненту з  $g = 2,003$  і шириною пік-пік  $1,27$  мТ (рис. 1). Лінії ЕПР з g-факторами в діапазоні  $g = 2,00$  і  $\Delta H_{pp} = 1,03$ – $1,37$  мТ відмічалися в спектрах ЕПР крові  $\approx 78\%$  хворих на РМЗ і мали вільнорадикальну природу.

У пацієнток репродуктивного віку з ER(+)/PR(+) статусом пухлин виявлено, що рівень ЦП майже вдвічі перевищував значення у донорів ( $0,78 \pm 0,08$  відн. од.) і становив  $1,50 \pm 0,13$  відн. од., тоді як у хворих з ER(-)/PR(-) статусом цей показник сягав  $1,06 \pm 0,08$  відн. од. ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). У жінок у постменопаузальний період з ER(+)/PR(+) статусом РМЗ рівень ЦП перевищував контрольні значення і становив  $1,21 \pm 0,09$  відн. од. ( $p < 0,05$ ), у пацієнток з ER(-)/PR(-) статусом цей показник визначався на рівні  $0,67 \pm 0,09$  відн. од. та достовірно не відрізнявся від значень у донорів ( $p > 0,05$ ).

Підтримка належного рівня ЦП забезпечує його функції транспорту міді в тканині, окиснення катехоламінів і серотоніну, антиоксидантного захисту та протизапальної дії. У пацієнток з ER(+)/PR(+) статусом пухлини в репродуктивному та постменопаузальному віці рівень ЦП значно вищий порівняно з хворими з ER(-)/PR(-) статусом РМЗ, а посилення антиоксидантного захисту в крові цих пацієнток може сприяти позитивній відповіді на хіміотерапію.

ТФ в організмі людини виконує різні функції, основна з яких полягає в транспортуванні заліза в клітини, що забезпечує процеси росту, проліферації, диференціювання, апоптозу клітин та є складовою системи захисту організму від накопичення «вільного» заліза. Апо-ТФ укомплектовується двома іонами заліза, які зв'язуються з молекулою білка у трьохвалентному стані ( $Fe^{3+}$ ). За фізіологічних умов лише 30% сайтів у ТФ заповнені іонами заліза [13, 16, 17].

У хворих на РМЗ у репродуктивному віці з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-) статусом виявлено рівень ТФ  $0,34 \pm 0,08$  і  $0,47 \pm 0,07$  відн. од. відповідно, що достовірно нижче порівняно з контролем —  $0,81 \pm 0,10$  відн. од. ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 2). Рівень ТФ у крові пацієнток постменопаузального віку з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-)

статусом становив  $0,71 \pm 0,10$  і  $0,98 \pm 0,15$  відн. од. відповідно та реєструвався з іншими спектральними характеристиками, набуваючи форми синглету, що може свідчити про зв'язування з молекулою білка більшої кількості іонів заліза та зміну його конформації.

MetHb (феридезоксигемоглобін у високоспіновому стані) утворюється внаслідок окисно-індукованого гемолізу та окиснення  $Fe^{2+}$  у гемоглобіні (Hb) супероксидними радикалами. Рівень MetHb у крові донорів не перевищує 1–1,5% ( $0,08 \pm 0,02$  відн. од.) від загального рівня Hb. У крові хворих на РМЗ постменопаузального віку з ER(-)/PR(-) статусом цей показник зростає до  $0,45 \pm 0,07$  відн. од. ( $p < 0,05$ ) за рахунок окиснення та накопичення «вільного» заліза при припиненні менструації (зниження втрат заліза), що призводить до перенавантаження організму цим елементом [1, 3]. Це також може відбуватися за рахунок декомпартменталізації іонів заліза внаслідок активації окисних пошкоджень ліпідів, білків, відновного перетворення ТФ на апо-ТФ, а також «виходу» депонованого заліза із феритину [18, 19]. Але MetHb може піддаватися подальшій деструкції з утворенням різних форм геміхромів — низькоспінових форм MetHb, тому його рівень у крові цих хворих може змінюватися в бік зменшення з накопиченням геміхромів. При наростанні рівня MetHb та «вільного» заліза виникає гемічна гіпоксія, порушується робота електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій та ендоплазматичного ретикулу. Підвищення концентрації в крові цих показників може бути важливим етіологічним фактором у розвитку та прогресуванні РМЗ, оскільки вони є каталізаторами реакцій аутоокиснення та подальшого зростання генерування СР.

У крові 78% хворих на РМЗ постменопаузального віку з ER(-)/PR(-) статусом пухлин виявлено також сигнали ЕПР, які характеризують MetHb ( $g = 6,0$ ), «вільне» залізо ( $g = 2,20-2,40$ ) та геміхроми ( $g = 2,62$ ), метаболіти естрогенів — хінони та убісеміхінони ( $g = 2,00$ ), вміст останніх зростає та прямо корелює зі стадією пухлинного процесу ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ).

Оксид азоту (NO) при зростанні його рівнів у крові дифундує в еритроцити та реагує з Hb [20, 21]. Відбувається окисно-відновна реакція, за якої NO утворює стабільний комплекс з Hb (NO-Hb), а двохвалентне залізо окиснюється до трьохвалентного.

У пацієток репродуктивного віку з ER(-)/PR(-) статусом РМЗ рівень NO-Hb (який має спектральні характеристики  $g_1 = 2,07$ ,  $g_2 = 1,98$ ,  $g_{\text{сеп.}} = 2,01$  та триплетне розщеплення) становив  $0,58 \pm 0,13$  відн. од. і достовірно перевищував такий при ER(+)/PR(+) статусі пухлин —  $0,31 \pm 0,07$  відн. од. ( $p < 0,05$ ). У хворих у постменопаузальному віці з ER(-)/PR(-) статусом пухлин цей показник сягав  $2,45 \pm 0,27$  відн. од., що у 1,5 раза вище порівняно з хворими, гормонорецепторний статус пухлин який був ER(+)/PR(+), —  $1,61 \pm 0,22$  відн. од. ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Слід зазначити, що цей показник у крові донорів не визначався.

Транспорт NO-Hb у метаболічно активну тканину забезпечує регулювання вазодилатації та кровопостачання. Цей механізм включає ковалентне зв'язування

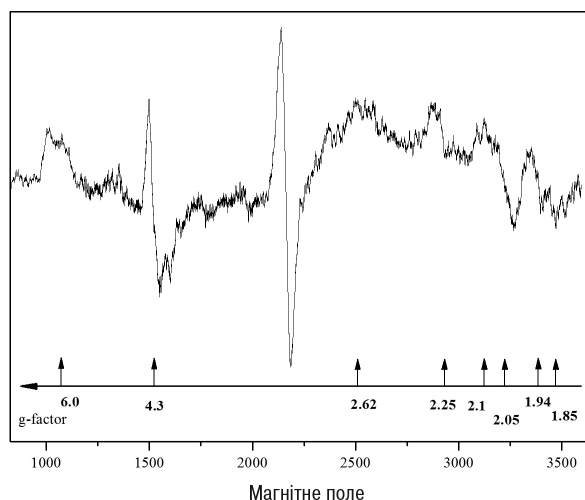


Рис. 1. Спектр ЕПР цільної крові 65-річної хворої на РМЗ з ER(-)/PR(-) статусом, який містить сигнали ЦП ( $g = 2,05$ ), ТФ ( $g = 4,25$ ), MetHb ( $g = 6,0$ ) та геміхромів ( $g = 2,62$ )

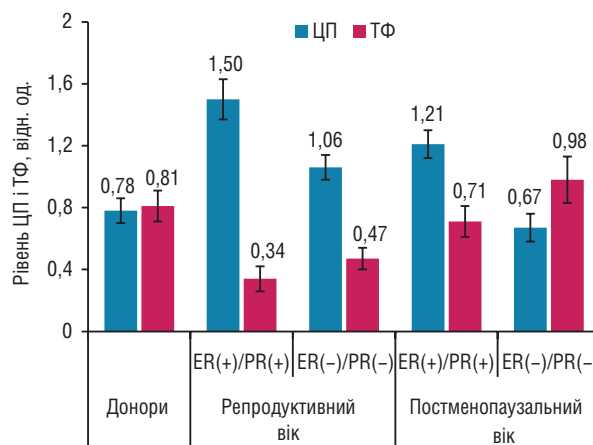
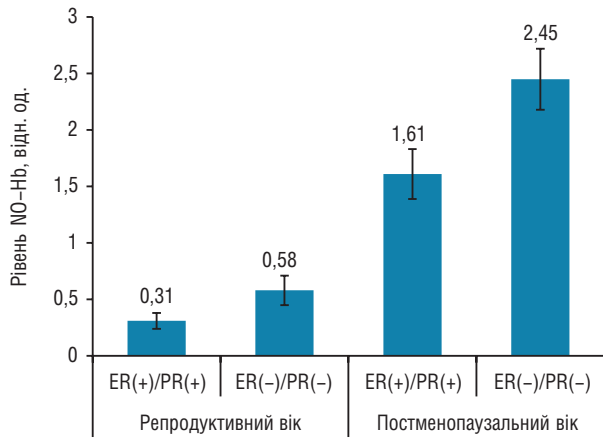


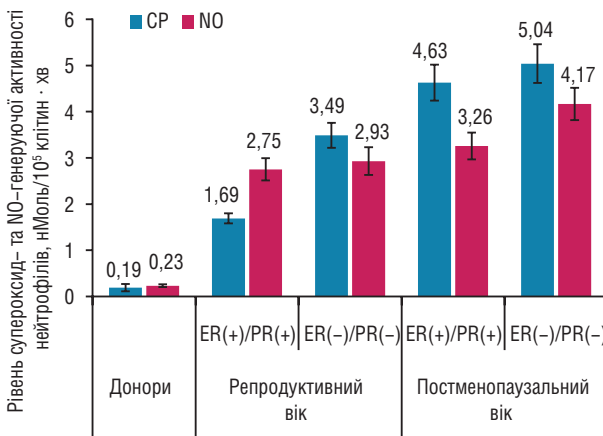
Рис. 2. Рівень ЦП та ТФ у крові хворих на РМЗ залежно від віку та гормонорецепторного статусу пухлин

NO з залишком цистеїну в  $\beta$ -ланцюзі Hb (Cys $\beta$ 93) з утворенням нітрозогемоглобіну (NO-Hb) з подальшим перенесенням NO до судинного ендотелію, що може бути новим терапевтичним напрямком при захворюваннях, пов'язаних із порушенням мікроциркуляторної перфузії та для оцінки ступеня оксигенації та деоксигенації Hb при різних патологічних станах. NO-Hb може перебувати у високоспіновому (T) та низькоспіновому (R) стані [2]. Найвищий рівень NO-Hb (до  $4,5 \pm 0,87$  відн. од.) було визначено у хворих на РМЗ у постменопаузальному віці з ER(-)/PR(-) статусом ( $n = 6$ ), який прямо корелював з рівнем NO-генеруючої активності нейтрофілів ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ).

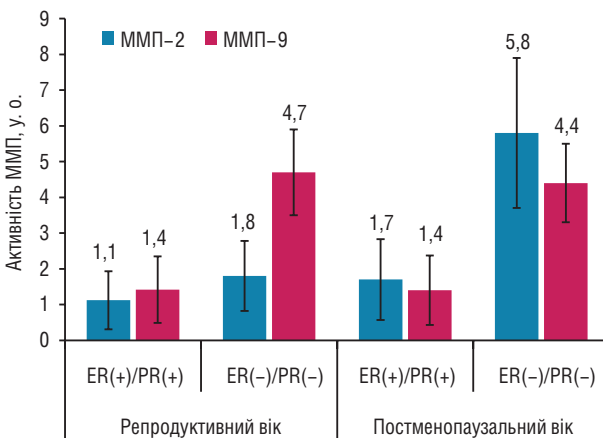
Рівень супероксид-генеруючої активності нейтрофілів у хворих на РМЗ у репродуктивному віці з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-) статусом пухлин (рис. 4) становив  $1,69 \pm 0,11$  та  $3,49 \pm 0,27$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв, що у 9 та 18 разів достовірно вище, ніж у донорів ( $0,19 \pm 0,08$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв). У пацієток постменопаузального віку з ER(+)/PR(+) статусом цей показник реєструвався на рівні  $4,63 \pm 0,39$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв, а з ER(-)/PR(-) —  $5,04 \pm 0,42$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв, що вище порівняно з хвори-



**Рис. 3.** Рівень NO-Hb у крові хворих на РМЗ залежно від віку та гормонорецепторного статусу пухлин



**Рис. 4.** Рівень супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів у хворих на РМЗ залежно від віку та гормонорецепторного статусу пухлин



**Рис. 5.** Активність желатиназ в сироватці крові хворих на РМЗ залежно від віку та гормонорецепторного статусу пухлин

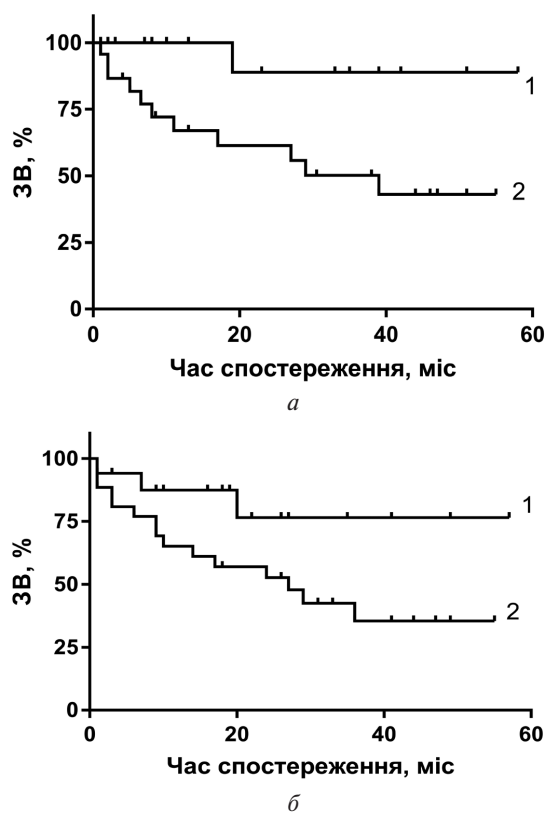
ми репродуктивного віку та донорами ( $p < 0,05$ ). NO-генеруюча активність нейтрофілів крові (див. рис. 4) у донорів становила  $0,23 \pm 0,03$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв. У хворих на РМЗ репродуктивного віку з ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-) статусом пухлин зазначений показник сягав  $2,75 \pm 0,24$  та  $2,93 \pm 0,30$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·

хв ( $p < 0,05$ ) відповідно. У пацієнок постменопаузального віку з ER(+)/PR(+) статусом рівень NO становив  $3,26 \pm 0,29$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв, з ER(-)/PR(-) статусом —  $4,17 \pm 0,35$  нМоль/10<sup>5</sup> клітин·хв. У крові хворих на РМЗ зростання рівнів оксиду азоту є наслідком посилення його синтезу іNOS нейтрофілів, а при надлишкових рівнях генерування він втрачає свої захисні функції та чинить вазодепресивну і цитотоксичну дію.

Ми визначили активність желатиназ у сироватці крові хворих на РМЗ репродуктивного віку та показали, що для пацієнок з ER(-)/PR(-) статусом пухлин молочної залози середній показник активності ММП-2 становить 1,8 у. о. та у 1,6 раза перевищує показник для пацієнок із ER(+)/PR(+) статусом РМЗ, але різниця статистично недостовірна. При цьому рівень активності ММП-9 у сироватці крові хворих з ER(-)/PR(-) статусом сягає 4,7 у. о., що у 3,3 раза вище від такого у хворих з ER(+)/PR(+) статусом ( $p < 0,05$ ) (рис. 5). У сироватці крові пацієнок постменопаузального віку виявлено значну достовірну різницю між хворими з ER(-)/PR(-) і ER(+)/PR(+) гормонорецепторним статусом пухлин як за рівнем активності ММП-2, так і за рівнем ММП-9. Таким чином, отримані дані співвідносяться з результатами низки інших досліджень [22–26] та свідчать про асоційованість високих рівнів ММП-9 з гормонорецепторним статусом пухлини у хворих на РМЗ. Такий зв'язок може бути результатом гормонозалежного контролю активності желатиназ, який, зважаючи на вищенаведені дані щодо генерування CP, може реалізуватися шляхом редокс-активації цих ферментів [27, 28].

Проаналізовано 5-річну загальну виживаність (ЗВ) хворих на РМЗ залежно від рівня вищезазначених показників. Статистично достовірну різницю виявлено при аналізі ЗВ залежно від рівня NO-Hb у крові (рис. 6). У хворих репродуктивного віку (рис. 6, а), у яких рівень NO-Hb був вищим за медіану ( $> 0,38$  відн. од.), 5-річна ЗВ становила 43%, медіана виживаності — 39 міс ( $\chi^2 = 5,6$ ,  $p = 0,02$ ). У хворих постменопаузального віку (рис. 6, б) з рівнем NO-Hb вище медіани ( $> 1,94$  відн. од.) 5-річна ЗВ становила 34%, медіана виживаності — 27 міс ( $\chi^2 = 3,6$ ,  $p = 0,05$ ).

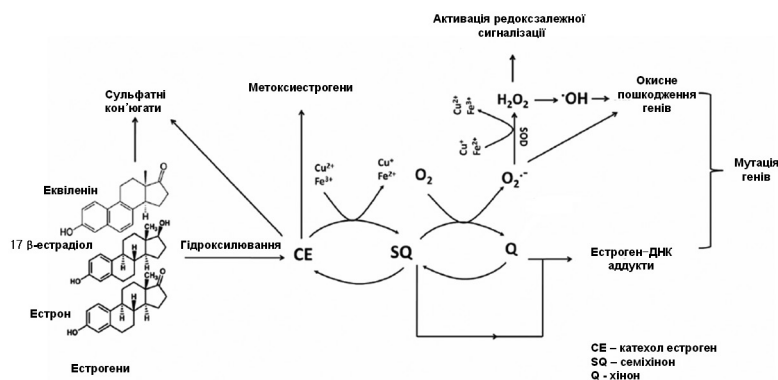
При поєднанні високих рівнів MetHb, геміхромів з локально високими концентраціями естрогену у молочних залозах активація генерування CP та активація ММП може каталізувати циклічне окиснення з деградацією мікрооточення клітин. Метаболіти естрогенів хінони та убісеміхінони, рівень яких зростає і які є джерелом генерування CP, можуть призводити до порушення редокс-стану крові. Естрогени ініціюють генерування CP, впливаючи на активність мітохондрій, за рахунок того, що фенольна гідроксильна група у положенні C<sub>3</sub> гормону може окиснюватися, акцептуючи електрон, або втрачати протон і діяти як прооксидант. Крім того, естрогени можуть метаболізувати до катехолів, які, окиснюючись до хінонів та убісеміхінонів у редокс-циклі, генерують CP. Природні та синтетичні естрогени викликають реакцію-відповідь у концентраціях з чітко визначеним діапазоном доз. При підвищенні дози естрогенів метаболічні реакції, які є нешкідливими при низьких рівнях, можуть викликати



**Рис. 6.** ЗВ хворих на РМЗ I–III стадій репродуктивного (а) та постменопаузального (б) віку залежно від рівня NO-Нб в крові

а: 1 —  $< 0,38$  відн. од. ( $n = 18$ ), медіана виживаності не досягнута; 2 —  $> 0,38$  відн. од. ( $n = 22$ ), медіана виживаності становить 39 міс ( $\chi^2 = 5,6$ ;  $p = 0,02$ ); б: 1 —  $< 1,94$  відн. од. ( $n = 17$ ), медіана виживаності не досягнута; 2 —  $> 1,94$  відн. од. ( $n = 25$ ), медіана виживаності становить 27 міс ( $\chi^2 = 3,6$ ;  $p = 0,05$ )

негативні наслідки, що включають окиснення естрогенів до відповідних хінонів, та посилювати генерування СР в окиснювальному циклі естерогенів, діетилstilbestролу та їхніх хінонів (рис. 7). Активність ферментів, що підтримують циклічне окиснення естрогенів та генерування СР, корелює з ініціацією розвитку пухлин в молочних залозах [1, 2, 4]. Порушення зв'язування з ТФ, феритином  $\text{Fe}^{3+}$  та порушення процесу окиснення  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$  ЦП призводять до накопичення комплек-



**Рис. 7.** Схема окисно-відновного циклу метаболізму естрогенів [29]

сів «вільного» заліза і геміхромів. Крім того, естрогени, їх метаболіти і «вільне» залізо активують асоційовану з окисненням проліферацію клітин. СР можуть виступати вторинними месенджерами в каскадах внутрішньоклітинної сигналізації, які індукують та підтримують онкогенний фенотип пухлинних клітин. За допомогою СР активуються мітоген-активовані протеїнкінази (MAP-кінази), AP-1 і NF- $\kappa$ B-шляхи передачі сигналу, які відповідають за транскрипцію генів, що беруть участь у процесі росту і трансформації клітин. Отже, накопичення СР, NO, NO-Нб, MetHb, геміхромів, убісемінонів або застосування гормонозамісної терапії може сприяти повторному окиснювальному циклінгу, що робить жінок у постменопаузі схильними до розвитку РМЗ та його прогресування [1–7].

## ВИСНОВОК

Редокс-стан крові хворих на РМЗ змінюється залежно від гормонорецепторного статусу пухлин, зокрема ER(+)/PR(+) та ER(-)/PR(-). Характерний для хворих на РМЗ редокс-стан крові формується зростанням супероксид- та NO-генеруючої активності нейтрофілів, появою значних рівнів NO-Нб, MetHb, геміхромів, убісемінонів і активності желатиназ. Виявлено вплив цих показників на перебіг захворювання та виживаність хворих на РМЗ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Fussell KC, Udasin RG, Smith PJ, et al.** Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells. *Carcinogenesis* 2011; **32** (8): 1285–93.
2. **Burlaka AP, Sidorik EP.** Redox-dependent signal molecules in mechanisms of tumor process. Kyiv: Naukova Dumka, 2014. 255 p. (in Ukrainian).
3. **Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, et al.** Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; **24** (suppl 6): vi7–23.
4. **Johar R, Sharma R, Kaur A, et al.** Role of reactive oxygen species in estrogen dependant breast cancer complication. *Anticancer Agents Med Chem* 2015; **16** (2): 190–9.
5. **Xi Huang.** Does iron have a role in breast cancer? *Lancet Oncol* 2008; **9** (8): 803–7.
6. **Torti SV, Torti FM.** Cellular iron metabolism in prognosis and therapy of breast cancer. *Crit Rev Oncog* 2013; **18** (5): 435–48.
7. **Burlaka AP, Ganusevich II, Vovk AV.** Superoxide radicals: initiation of metastases in patients with breast cancer. *Oncology* 2017; **19** (3): 180–4 (in Ukrainian).
8. **Song N, Sung H, Choi JY, et al.** Preoperative serum levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and survival of breast cancer among Korean women. *Cancer Epidem Biomarkers Prev* 2012; **21** (8): 1371–80.
9. **Ganusevich II, Mamontova LA, Merentsev SP, et al.** Serum gelatinases as markers for monitoring of the clinical course of gastric cancer. *Oncology* 2015; **17**: 85–9 (in Ukrainian).
10. **Burlaka AP, Gafurov MR, Iskhakova KB, et al.** Electron paramagnetic resonance in the experimental oncology: implementation examples of the conventional approaches. *BioNanoScience* 2016; **6** (4): 431–6.
11. **Burlaka AP, Ganusevich II, Golotiuk VV, et al.** Superoxide- and NO-dependent mechanisms of antitumor and antimetastatic effect of L-arginine hydrochloride and coenzyme Q10. *Exp Oncol* 2016; **38**: 31–5.

12. Kovalchuk LV, Ignatieva GA, Gankovska LV. Immunology, workshop. M: GEOTAR-Media, 2010. 194 p. (in Russian).
13. Burlaka AP, Ganusevich II, Gafurov MR, *et al.* Electron paramagnetic resonance study of tumor affected bone marrow. *Cancer Microenvironment* 2013; **6**: 431–6.
14. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; **53**: 457–81.
15. Kutsenko LO, Kaidashev IP. The place of ceruloplasmin among the acute phase proteins as a marker of systemic inflammation. *Lab Diagnostics* 2011; **3** (57) 59–68 (in Russian).
16. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**: 188–202.
17. Burlaka AP, Golotiuk VV, Vovk AV, *et al.* Blood redox state and survival in patients with rectal cancer. *Med Clin Chem* 2015; **17** (4): 22–8 (in Ukrainian).
18. Akhateeb AA, Han BC, Connor JR. Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. *Breast Cancer Res Treat* 2013; **1372**: 733–44.
19. Wnag W, Knovich MA, Coffman LG, *et al.* Serum ferritin: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1880**: 760–9.
20. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, *et al.* The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis* 2013; **34** (3): 503–12.
21. Dudok K, Kaniuka O, Fedorovych A, *et al.* No-dependent changing of the ligand form of hemoglobin in peripheral blood of people. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology* 2016; **73**: 130–6 (in Ukrainian).
22. Burlaka AP, Golotiuk VV, Vovk AV, *et al.* Influence of neutrophils O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO-generating activity on the effectiveness of neoadjuvant radiotherapy in patients with rectal cancer. *Oncology* 2015; **17**: 253–7 (in Ukrainian).
23. Pietraforte D, Vona R, Marchesi A, *et al.* Redox control of platelet functions in physiology and pathophysiology. *Antioxidants Redox Signaling* 2014; **21**: 177–93.
24. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, *et al.* Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2007; **96** (6): 903–11.
25. Mehner C, Hockla A, Miller E, *et al.* Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2014; **5** (9): 2736–49.
26. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol* 2008; **19** (9): 1566–72.
27. Sag CM, Santos CX, Shah AM. Redox regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **73**: 103–11.
28. Mikheda Y, Görlach A, Knaus UG, Daibera A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biol* 2015; **5**: 275–89.
29. Okoh V, Deoraj A, Roy D. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1815** (1): 115–33.

## PROGNOSTIC VALUE OF BLOOD REDOX-STATE INDICATORS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

A.P. Burlaka<sup>1</sup>, I.I. Ganusevich<sup>1</sup>, A.V. Vovk<sup>1</sup>,  
C.M. Lukin<sup>2</sup>, C.B. Virko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,  
Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>V.Ye. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics,  
NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Summary. Objective:** to investigate the level of ceruloplasmin (CP), transferrin (TF), NO-hemoglobin (NO-Hb), methemoglobin (MetHb), superoxide-

and NO-generating activity of neutrophils and matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2 and -9) in the blood of patients with breast cancer in connection with the hormone receptor status of tumors of patients with breast cancer in II–III stages. **Object and methods:** blood samples were studied in patients with breast cancer II–III stages in reproductive and postmenopausal age. The level of CP, TF, «free» iron, hemichromes, MetHb, NO-Hb, and ubisemiquinone was investigated by the method of electron paramagnetic resonance (EPR) in a low-temperature mode (77 K). The rate of generation of superoxide radicals (SR) by neutrophils was determined by EPR method at room temperature using the spin capture TEMPONE-H («Sigma»). The NO-generating activity of blood neutrophils was determined by the EPR method using Spin Traps technology at a temperature of 77 K (spin trap — diethyldithiocarbamate). The level of active forms of gelatinase in serum was determined by zymography in a polyacrylamide gel. **Results:** in patients with reproductive and postmenopausal age with ER(+)/PR(+) and ER(-)/PR(-) status, the level of CP exceeded the values characteristic of donors, and the level of TF in them was significantly lower than control. An increase in NO-Hb content in blood was observed, this indicator was highest in postmenopausal patients with ER(-)/PR(-) status and directly correlated with NO-generating activity of neutrophils ( $r = 0.56$ ;  $p < 0.05$ ). The activity of MMP-9 in the serum of patients with ER(-)/PR(-) status in 3.3 times significantly exceeded that for patients with ER(+)/PR(+) status. In the blood of 78% of patients with postmenopausal breast cancer with the status of tumors with ER(-)/PR(-), increased content of estrogen metabolites — quinones and ubisemiquinones was observed. The level of the latter was directly correlated with the stage of the tumor process ( $r = 0.58$ ;  $p < 0,05$ ). It has been established that neutrophils in the blood of patients of reproductive age with ER(+)/PR(+) and ER(-)/PR(-) status of tumors generate SR with a rate 9 and 18 times higher compared to donors, respectively, and NO — more than 12 times in both subgroups. **Conclusion:** reactions of the redox state of the blood in patients with breast cancer, whose changes depend on the hormone receptor status of the tumors, in particular ER(+)/PR(+) and ER(-)/PR(-), are revealed.

**Key Words:** breast cancer, hormone receptor status, blood redox-state, superoxide radicals, nitric oxide.

### Адреса для листування:

Бурлака А.П.  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології, онкології  
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
E-mail: apburlaka@gmail.com

Одержано: 28.12.2017