

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

освітній ступінь – магістр

на тему: **«Особливості метаболізму гепсидину за анемічного стану у онкологічних пацієнтів хворих на колоректальний рак»**

Виконав: студентка 2-го року навчання,

Спеціальності 091 Біологія та біохімія

Гайда Людмила Русланівна

Керівник: Білько Н. М. доктор мед. наук, професор, Заслужений
робітник освіти України.

Рецензент: Колибо Д. В., професор, докт. біол. наук, головної науковий
співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Київ-2025

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АХЗ	–	анемія хронічних захворювань;
ГП	–	гепсидин;
ЕПО	–	еритропоетин;
ЕР	–	еритропоетинові рецептори;
ЗДА	–	залізодефіцитна анемія;
ІІ	–	інтерлейкін;
ІНФ	–	інтерферон;
КМ	–	кістковий мозок;
КРР	–	колоректальний рак;
ЛПС	–	ліполісахариди;
%НТЗ	–	відсоток насичення трансферину залізом;
ФНП	–	фактору некрозу пухлини;
CD126	–	cluster of differentiation 126 (кластер диференціації 126);
DMT	–	divalent metal transporter (двовалентний транспортер металу);
HIF-1	–	hypoxia-inducible factor 1 (фактор 1, що індукується гіпоксією);
JAK	–	Janus kinase (тирозин кіназа);
NCCN	–	national comprehensive cancer network (національна загальна онкологічна мережа);
STAT	–	signal transducer and activator of transcription (транскрипційний фактор перетворення сигналів та активаторів транскрипції);
ТҮК	–	tyrosine kinase (тирозин кіназа);

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ПАТОБІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ АНЕМІЧНИХ СТАНІВ У ОНКОЛОГІЧНИХ ПАЦІЄНТІВ.....	7
1.1. Роль гепсидину в механізмах розвитку анемії.....	7
1.2. Молекулярні механізми порушення гомеостазу заліза при злоякісних новоутвореннях	16
1.3. Регуляція метаболізму заліза та роль його порушення у патогенезі анемії у хворих на онкологічний профіль.....	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	26
2.1. Матеріали та реактиви.....	26
2.2. Умови проведення дослідження.....	28
2.3. Приготування препаратів крові.....	32
2.4. Визначення концентрації заліза у сироватці крові.....	36
2.5. Лабораторні дослідження серологічних маркерів.....	40
2.6. Статистична обробка даних	47
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ..	51
3.1. Концентрація сироваткового заліза у пацієнтів з анемічним синдромом за колоректального раку.....	51
3.2. Метаболізм гепсидину, як основного регулятора метаболізму заліза за колоректального раку	64
ВИСНОВКИ	72
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	76

ВСТУП

Актуальність дослідження. Анемія є одним із найпоширеніших ускладнень у онкологічних пацієнтів, що суттєво погіршує якість життя, знижує ефективність протипухлинної терапії та негативно впливає на прогноз захворювання. За даними сучасних досліджень, анемічні стани спостерігаються у 30-90% хворих з різними видами злоякісних новоутворень, причому частота та тяжкість анемії значно зростають під час проведення хіміо- та променевої терапії. Патогенез анемії при злоякісних новоутвореннях є мультифакторним та включає порушення регуляції метаболізму заліза на різних рівнях – від системного до клітинного. Центральну роль у цих процесах відіграє гепсидин – пептидний гормон, який регулює системний гомеостаз заліза через взаємодію з феропортином. Відкриття гепсидину та встановлення його ролі в патогенезі анемії хронічних захворювань відкрило нові перспективи для розуміння молекулярних механізмів розвитку анемічних станів у онкологічних пацієнтів та розробки таргетних підходів до їх корекції. Незважаючи на значний прогрес у дослідженні патобіохімічних особливостей анемії при злоякісних новоутвореннях, багато аспектів цієї проблеми залишаються недостатньо вивченими, що обумовлює актуальність та доцільність даного дослідження.

Мета дослідження полягає у оцінити особливості метаболізму гепсидину у пацієнтів з анемічним статусом на ранніх та пізніх стадіях колоректального раку. Досягнення поставленої мети передбачає виконання таких завдань:

1. Проаналізувати сучасні уявлення щодо ролі гепсидину в регуляції метаболізму заліза та патогенезі анемії хронічного захворювання при онкопатології.
2. Визначити вміст гепсидину, феритину, інтерлейкіну-6 та сироваткового заліза у пацієнтів із колоректальним раком на різних стадіях захворювання.

3. Оцінити взаємозв'язок між рівнем гепсидину, показниками запалення та параметрами залізо залежного обміну крові.
4. Встановити патогенетичні відмінності анемічного синдрому залежно від стадії колоректального раку для подальшого обґрунтування корекційних підходів.

Об'єктом дослідження є механізми порушення обміну заліза, зумовлені гепсидином, у пацієнтів із колоректальним раком та анемією хронічного захворювання, зокрема взаємозв'язок між рівнем гепсидину, депонуванням заліза в макрофагах та порушенням еритропоезу.

Предметом дослідження є метаболічні особливості гепсидину та регуляція залізо залежних процесів у хворих на колоректальний рак із супутньою анемією запалення.

Методологічною основою дослідження є системний підхід до вивчення патобіохімічних процесів із застосуванням комплексу сучасних біохімічних, імуноферментних, молекулярно-генетичних, клініко-лабораторних та статистичних методів. Дослідження проводилося з використанням зразків крові та тканин онкологічних пацієнтів, а також із застосуванням відповідних клітинних та тваринних моделей.

Гіпотеза дослідження полягає в тому, що порушення регуляції гепсидину та метаболізму заліза є ключовим патогенетичним механізмом розвитку анемії у онкологічних пацієнтів, і цілеспрямована корекція цих порушень може суттєво покращити ефективність лікування та якість життя хворих.

Наукова новизна роботи полягає в комплексному дослідженні патобіохімічних механізмів розвитку анемії у онкологічних пацієнтів, виявленні особливостей регуляції метаболізму заліза при різних видах злоякісних новоутворень та ідентифікації нових молекулярних мішеней для терапевтичного впливу. Вперше встановлено взаємозв'язок між рівнем гепсидину, активністю пухлинного процесу та тяжкістю анемічного синдрому.

Розширено уявлення про молекулярні механізми порушення гомеостазу заліза на системному та клітинному рівнях при онкологічних захворюваннях.

Теоретичне значення дослідження полягає в поглибленні розуміння молекулярних основ взаємозв'язку між злоякісними новоутвореннями, метаболізмом заліза та розвитком анемії. Отримані результати доповнюють сучасні концепції патогенезу анемії хронічних захворювань та формують теоретичну базу для розробки нових діагностичних та терапевтичних підходів.

Практичне значення роботи визначається розробкою та впровадженням нових методів діагностики та лікування анемії у онкологічних пацієнтів на основі виявлених патобіохімічних особливостей. Запропоновано алгоритм диференційної діагностики різних форм анемії у онкологічних хворих з урахуванням показників метаболізму заліза та рівня гепсидину. Обґрунтовано підходи до персоналізованої терапії анемічних станів з використанням таргетних препаратів, спрямованих на корекцію порушень метаболізму заліза.

Структура роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована таблицями та рисунками. Перший розділ присвячений патобіохімічним особливостям анемічних станів у онкологічних пацієнтів і містить три підрозділи, що розкривають роль гепсидину в механізмах розвитку анемії, молекулярні механізми порушення гомеостазу заліза при злоякісних новоутвореннях та регуляцію метаболізму заліза у пацієнтів онкологічного профілю.

РОЗДІЛ 1. ПАТОБІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ АНЕМІЧНИХ СТАНІВ У ОНКОЛОГІЧНИХ ПАЦІЄНТІВ

1.1. Роль гепсидину в механізмах розвитку анемії

Гепсидин являє собою пептидний гормон, який синтезується переважно гепатоцитами печінки та відіграє центральну роль у регуляції гомеостазу заліза в організмі людини. Відкриття гепсидину на початку ХХІ століття стало революційним проривом у розумінні механізмів контролю метаболізму заліза та патогенезу різноманітних порушень обміну заліза, включаючи анемічні стани різної етіології. Гепсидин функціонує як негативний регулятор всмоктування заліза в кишечнику та його вивільнення з макрофагів ретикулоендотеліальної системи та гепатоцитів. Молекулярна структура гепсидину представлена невеликим пептидом, який складається з 25 амінокислотних залишків та містить чотири дисульфідні зв'язки, що формують характерну шпилькоподібну конформацію молекули. Синтез гепсидину кодується геном HAMP, розташованим на 19-й хромосомі людини, та підлягає складній багаторівневій регуляції, яка забезпечує тонке налаштування гомеостазу заліза відповідно до потреб організму [1, 3, 5].

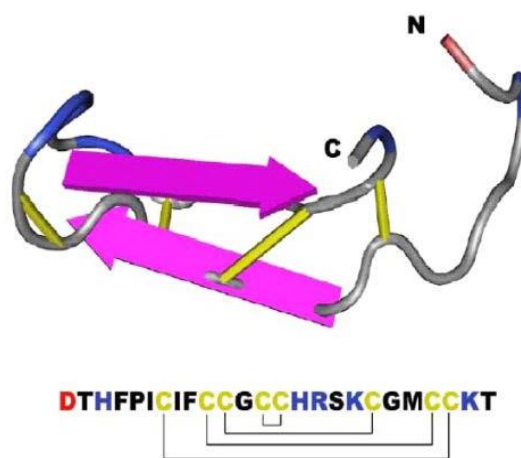


Рис. 1.1. Структура гепсидину

Гепсидин належить до групи антимікробних пептидів родини дефенсинів та представляє собою невеликий поліпептид, що складається з 25 амінокислотних залишків, утворюючи характерну β -шпилькову структуру, стабілізовану чотирма дисульфідними містками між цистеїновими залишками. Просторова конфігурація молекули гепсидину надає пептиду високу стабільність у біологічних рідинах та забезпечує специфічність взаємодії з молекулярною мішенню. Синтез гепсидину контролюється геном НАМР, локалізованим на хромосомі 19q13.1, експресія якого найбільш активно відбувається в гепатоцитах печінки, хоча низькі рівні експресії зафіксовано також у макрофагах, адипоцитах та клітинах нирок. Первинний транскрипт піддається посттрансляційним модифікаціям з утворенням препрогепсидину довжиною 84 амінокислотних залишки, який послідовно розщеплюється до прогепсидину (60 амінокислот) та зрілого гепсидину-25. Менш активні форми гепсидину, такі як гепсидин-22 та гепсидин-20, утворюються внаслідок подальшого протеолізу N-кінцевої частини молекули [2].

Молекулярний механізм дії гепсидину реалізується через його взаємодію з феропортином - трансмембранним білком, який функціонує як єдиний відомий експортер заліза з внутрішньоклітинного простору в позаклітинне середовище. Феропортин, продукт гена SLC40A1, локалізується переважно на плазматичній мембрані клітин, залучених до метаболізму заліза – ентероцитів дванадцятипалої кишки, макрофагів ретикулоендотеліальної системи та гепатоцитів. Молекулярна структура феропортину представлена 12 трансмембранними доменами з цитоплазматичними N- та C-кінцевими ділянками. Зв'язування гепсидину відбувається з високою афінністю через взаємодію з екстрацелюлярною петлею феропортину, причому критичну роль у формуванні комплексу відіграє залишок цистеїну в положенні 326. Конформаційні зміни, викликані утворенням такого комплексу, запускають каскад внутрішньоклітинних сигнальних реакцій, що призводять до фосфорилування цитоплазматичних тирозинових залишків феропортину Янус-кіназами (JAK) [14].

Після зв'язування гепсидину з феропортином активується складний процес інтерналізації утвореного комплексу, що включає фосфорилування цитоплазматичних доменів феропортину та рекрутування адапторних білків, зокрема β -арестину. Феропортин разом із зв'язаним гепсидином піддається ендоцитозу з формуванням клатрин-покритих везикул, які згодом зливаються з ранніми ендосомами. Процес ендоцитозу феропортину залежить від убіквітинування його цитоплазматичних доменів, що сприяє сортуванню інтерналізованого комплексу в мультивезикулярні тільца. Подальше транспортування мультивезикулярних тілець до лізосом призводить до протеолітичної деградації феропортину під дією лізосомальних гідролаз. Результатом деградації феропортину стає значне зменшення кількості функціонально активних молекул експортера заліза на плазматичній мембрані, що блокує вивільнення заліза з клітини в кровообіг та призводить до зниження концентрації заліза в плазмі крові [15].

Феропортин в ентероцитах дванадцятипалої кишки локалізується переважно на базолатеральній мембрані та забезпечує трансепітеліальний транспорт заліза з просвіту кишечника в порталний кровообіг. Абсорбція заліза в кишечнику розпочинається з транспорту іонів двовалентного заліза через апікальну мембрану ентероцитів за допомогою трансмембранного білка DMT1 (divalent metal transporter 1). Відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} перед транспортом каталізується феррeredуктазою Dcytb (duodenal cytochrome b), локалізованою на апікальній мембрані. Всередині ентероцитів залізо може зберігатися у складі феритину або транспортуватися до базолатеральної мембрани для експорту в кровообіг через феропортин. Зв'язування гепсидину з феропортином на базолатеральній мембрані ентероцитів призводить до інтерналізації та деградації останнього, блокуючи вихід заліза з ентероцитів у кровотік. Оскільки тривалість життя ентероцитів становить приблизно 2-3 доби, накопичене в них залізо втрачається під час фізіологічної десквамації епітеліальних клітин. Таким чином, гепсидин-індукована інтерналізація феропортину на ентероцитах забезпечує швидке зниження абсорбції

аліментарного заліза та становить основний механізм регуляції надходження заліза з кишечника в організм [19].

Макрофаги ретикулоендотеліальної системи, зокрема селезінки та печінки, відіграють ключову роль у рециркуляції заліза, вивільняючи залізо з фагоцитованих старіючих еритроцитів. Щоденно приблизно 20-25 мг заліза утилізується макрофагами з еритроцитів, які завершили свій життєвий цикл (120 днів). Процес рециркуляції заліза в макрофагах включає кілька етапів: фагоцитоз старіючих еритроцитів, деградацію гемоглобіну в фаголізосомах, розщеплення гему гемоксигеназою-1 з вивільненням заліза, транспорт заліза з фаголізосом у цитоплазму через DMT1, тимчасове зберігання заліза у складі феритину та експорт заліза через феропортин у плазму, де воно зв'язується з трансферином. Феропортин локалізується на плазматичній мембрані макрофагів та забезпечує експорт двовалентного заліза, яке потім окиснюється до Fe^{3+} церулоплазміном або гепестином перед зв'язуванням з трансферином. Взаємодія гепсидину з феропортином на мембрані макрофагів призводить до інтерналізації та деградації експортера, блокуючи вивільнення заліза з макрофагів. Накопичення заліза в макрофагах у формі феритину та гемосидерину становить один з основних патогенетичних механізмів анемії хронічних захворювань, при якій запальні стимули індукують синтез гепсидину, що призводить до секвестрації заліза в макрофагах та його недоступності для еритропоезу, незважаючи на достатні загальні запаси заліза в організмі [2].

Гепатоцити печінки не тільки синтезують гепсидин, але й відіграють важливу роль у метаболізмі заліза, забезпечуючи його депонування та мобілізацію з депо. Залізо надходить у гепатоцити кількома шляхами: у складі комплексу з трансферином через рецептор-опосередкований ендоцитоз, через NTBI (non-transferrin bound iron) транспортери ZIP14 та DMT1, а також у складі феритину через специфічні рецептори. Усередині гепатоцитів залізо може зберігатися у складі феритину або експортуватися в кровообіг через феропортин, який локалізується на синусоїдальній мембрані. У гепатоцитах

феропортин експресується переважно в перипортальній зоні печінкової часточки, де концентрація кисню вища. Взаємодія гепсидину з феропортином на мембрані гепатоцитів призводить до інтерналізації та деградації останнього, блокуючи експорт заліза з клітин та сприяючи його накопиченню у складі феритину. За умов підвищеного рівня гепсидину, як при хронічних запальних процесах або інфекціях, мобілізація заліза з гепатоцитів знижується, що разом із блокадою всмоктування в кишечнику та секвестрацією заліза в макрофагах призводить до зниження рівня заліза в циркуляції та розвитку функціонального дефіциту заліза [3].

Регуляція активності феропортину гепсидином на молекулярному рівні має додаткові механізми, пов'язані з модуляцією пост-ендоцитарного трафіку та відновлення мембранної локалізації феропортину. Після інтерналізації частина феропортину може уникнути лізосомальної деградації та рециркулювати на плазматичну мембрану через систему рециклінгових ендосом. Баланс між деградацією та рециклінгом феропортину залежить від низки факторів, включаючи концентрацію гепсидину, тип клітин та активність внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Зокрема, залученість убіквітин-лігаз, таких як Nedd4-2, у модифікацію феропортину визначає його долю після ендоцитозу. Убіквітинування феропортину по лізиновим залишкам сприяє його сортуванню в лізосомальний шлях деградації, тоді як деубіквітинування може сприяти рециклінгу на плазматичну мембрану. Динамічний баланс між ендоцитозом, деградацією та рециклінгом феропортину забезпечує тонку регуляцію експорту заліза з клітин відповідно до системних потреб організму.

Структурно-функціональні дослідження взаємодії гепсидину з феропортином на молекулярному рівні виявили кілька критичних амінокислотних залишків, які визначають специфічність та афінність зв'язування. N-термінальна ділянка гепсидину, зокрема перші п'ять амінокислотних залишків, є ключовою для біологічної активності пептиду. Мутації або делеції в межах N-термінальної ділянки гепсидину призводять до значного зниження або повної втрати здатності індукувати інтерналізацію

феропортину. У феропортині критичну роль відіграє цистеїновий залишок у положенні 326, який формує тіол-дисульфідний місток із гепсидином. Мутації цього залишку в феропортині асоціюються з резистентністю до гепсидину та розвитком спадкової гемохроматози IV типу (хвороба феропортину). Кристалографічні дослідження комплексу гепсидин-феропортин виявили, що гепсидин зв'язується з екстрацелюлярною петлею феропортину, вклинюючись між трансмембранними доменами та стабілізуючись через гідрофобні та електростатичні взаємодії, а також через формування дисульфідного містка. Конформаційні зміни, викликані зв'язуванням гепсидину, передаються через трансмембранні домени до цитоплазматичних ділянок феропортину, ініціюючи сигнальний каскад, що призводить до ендоцитозу.

Надходження заліза в кров із клітинних депо та з кишечника суворо регулюється на молекулярному рівні через взаємодію гепсидину з феропортином у різних типах клітин. Системний ефект гепсидину проявляється у координованому зменшенні надходження заліза в кровообіг з трьох основних джерел: ентероцитів дванадцятипалої кишки, макрофагів ретикулоендотеліальної системи та гепатоцитів. Підвищення рівня гепсидину в плазмі крові, яке спостерігається при запальних процесах, інфекціях, надлишку заліза в організмі, призводить до швидкого зниження концентрації заліза в плазмі крові (гіпоферемії) через блокаду його надходження з усіх згаданих джерел. Гіпоферемія, у свою чергу, обмежує доступність заліза для мікроорганізмів, які потребують його для росту та розмноження, становлячи важливий компонент неспецифічного імунного захисту, а також для пухлинних клітин, які характеризуються підвищеними потребами в залізі для проліферації. Однак тривала активація продукції гепсидину призводить до функціонального дефіциту заліза для еритропоезу та розвитку анемії хронічних захворювань, що погіршує якість життя пацієнтів та може негативно впливати на прогноз основного захворювання.

Патофізіологічна роль гепсидин-феропортинової осі проявляється при різноманітних порушеннях метаболізму заліза. Надмірна продукція гепсидину

характерна для анемії хронічних захворювань, включаючи анемію при злоякісних новоутвореннях, аутоімунних захворюваннях, хронічних інфекціях. Підвищена експресія гепсидину при злоякісних новоутвореннях зумовлена активацією запальних цитокінів, зокрема інтерлейкіну-6, а також може бути результатом ектопічної продукції гепсидину самими пухлинними клітинами. Дослідження показали, що деякі пухлини, зокрема гепатоцелюлярна карцинома, рак молочної залози, рак легень, здатні експресувати гепсидин, створюючи локальний градієнт концентрації, який впливає на метаболізм заліза в мікрооточенні пухлини. Локальна продукція гепсидину пухлинними клітинами може становити механізм перерозподілу заліза в мікрооточенні пухлини на користь пухлинних клітин за рахунок інших клітин, зокрема макрофагів.

Молекулярні дослідження механізму дії гепсидину на феропортин відкривають перспективи для розробки таргетних терапевтичних підходів до корекції порушень метаболізму заліза. Інгібітори взаємодії гепсидину з феропортином, такі як моноклональні антитіла проти гепсидину або міметики феропортину, можуть бути ефективними при лікуванні анемії хронічних захворювань, зокрема анемії у онкологічних пацієнтів. Модулятори сигнальних шляхів, що регулюють експресію гепсидину, зокрема інгібітори IL-6/JAK/STAT3 сигналінгу або активатори BMP/SMAD інгібіторів, також розглядаються як потенційні терапевтичні агенти. Розуміння молекулярних механізмів інтерналізації та деградації феропортину під впливом гепсидину дозволяє розробляти підходи до модуляції пост-ендоцитарного трафіку феропортину, спрямовані на збільшення його рециклінгу та відновлення мембранної локалізації.

Дослідження останніх років виявили додаткові механізми регуляції феропортину на посттрансляційному рівні, незалежні від гепсидину, які можуть модулювати експорт заліза з клітин. Феропортин може піддаватися протеолізу під дією матриксних металопротеїназ, зокрема MMP2 та MMP9, які експресуються в мікрооточенні пухлини та можуть впливати на доступність

феропортину на клітинній поверхні. Окислення феропортину активними формами кисню, продукція яких підвищена при запальних процесах та пухлинному рості, може змінювати конформацію білка та його функціональну активність. Структурні особливості феропортину, зокрема наявність множинних трансмембранних доменів, роблять його чутливим до змін ліпідного складу мембрани, які спостерігаються при онкологічних захворюваннях. Фосфорилування феропортину кіназами, активність яких змінюється при пухлинному рості, такими як казеїнкіназа 2 або протеїнкіназа С, може модулювати його функціональну активність та чутливість до гепсидину.

Гепсидин-феропортинова взаємодія становить центральний молекулярний механізм регуляції системного гомеостазу заліза та відіграє ключову роль у патогенезі анемії при злоякісних новоутвореннях. Розуміння молекулярних основ цієї взаємодії та її порушень при різних патологічних станах відкриває нові перспективи для розробки таргетних терапевтичних підходів до корекції порушень метаболізму заліза та лікування анемії у онкологічних пацієнтів.

Регуляція експресії гепсидину здійснюється на транскрипційному рівні та залежить від багатьох факторів. Основними стимулами для підвищення синтезу гепсидину є високий рівень заліза в організмі та запальні процеси. При збільшенні концентрації заліза в плазмі крові та насичення трансферину залізом активується сигнальний шлях BMP/SMAD, який включає зв'язування кісткових морфогенетичних білків з їх рецепторами на поверхні гепатоцитів. Коректором у цьому процесі виступає гемоювелін, мутації якого призводять до порушення регуляції гепсидину та розвитку спадкового гемохроматозу. Активація BMP-рецепторів призводить до фосфорилування білків SMAD, їх транслокації в ядро та активації транскрипції гена HAMP. Запальні процеси стимулюють продукцію гепсидину через інтерлейкін-6 та активацію сигнального шляху JAK/STAT3. Зв'язування ІЛ-6 зі своїм рецептором на

гепатоцитах активує янус-кінази, які фосфорилують STAT3, що транслокується в ядро та індукує транскрипцію гена гепсидину [15, 18, 21].

Супресія експресії гепсидину відбувається при анемії, гіпоксії та підвищеній еритропоетичній активності. Гіпоксія призводить до стабілізації гіпоксія-індукованих факторів, особливо HIF-2 α , який пригнічує транскрипцію гепсидину та одночасно стимулює експресію генів, відповідальних за всмоктування та транспорт заліза, включаючи DMT1, DcytB та феропортин. Еритроферон - гормон, який продукується еритробластиками у відповідь на еритропоетин, є потужним інгібітором експресії гепсидину. Механізм дії еритроферону полягає в інгібуванні сигнального шляху BMP/SMAD, що забезпечує збільшення доступності заліза для еритропоезу при підвищених потребах у синтезі гемоглобіну. Додатковими факторами, які знижують рівень гепсидину, є дефіцит заліза, підвищена концентрація тестостерону та деякі генетичні мутації [29].

Патологічні зміни рівня гепсидину лежать в основі багатьох захворювань, пов'язаних з порушенням метаболізму заліза. Надмірна продукція гепсидину спостерігається при анемії хронічних захворювань, включаючи онкологічні процеси, інфекційні та запальні захворювання. Високий рівень гепсидину блокує всмоктування заліза в кишечнику та його вивільнення з макрофагів, що призводить до функціонального дефіциту заліза - стану, коли організм має достатні запаси заліза, але воно недоступне для еритропоезу. Знижена продукція гепсидину характерна для спадкового гемохроматозу, залізодефіцитної анемії, неефективного еритропоезу при таласемії та деяких мієлодиспластичних синдромах. Недостатність гепсидину призводить до надмірного всмоктування заліза в кишечнику та його накопичення в паренхіматозних органах з розвитком токсичних ефектів [31, 34, 37].

У онкологічних пацієнтів порушення регуляції гепсидину має особливе значення для патогенезу анемії. Пухлинні клітини та асоційоване з пухлиною запалення стимулюють продукцію прозапальних цитокінів, зокрема IL-6, IL-

1β , TNF- α , які індукують синтез гепсидину в печінці. Крім того, деякі види пухлин здатні до ектопічної продукції гепсидину, що створює додатковий механізм розвитку функціонального дефіциту заліза. Дослідження останніх років виявили експресію гепсидину в клітинах колоректального раку, гепатоцелюлярної карциноми, раку молочної залози та інших злоякісних новоутворень. Локальна продукція гепсидину пухлинними клітинами може слугувати механізмом автокринної регуляції метаболізму заліза в пухлині, забезпечуючи підвищені потреби швидко проліферуючих клітин у залізі для синтезу ДНК, мітохондріального дихання та інших метаболічних процесів [39, 42, 45].

Терапевтичні підходи до корекції порушень, пов'язаних з гепсидином, активно розробляються та включають кілька напрямків. Антагоністи гепсидину, такі як моноклональні антитіла проти гепсидину або інгібітори його продукції, досліджуються для лікування анемії хронічних захворювань. Агоністи гепсидину або міметики можуть бути корисними при станах з надмірним накопиченням заліза. Модулятори сигнальних шляхів, які регулюють експресію гепсидину, включаючи інгібітори BMP-сигналізації або JAK/STAT, також розглядаються як потенційні терапевтичні мішені. Розуміння ролі гепсидину в патогенезі анемії відкриває нові можливості для персоналізованої терапії, спрямованої на корекцію специфічних порушень метаболізму заліза [52].

1.2. Молекулярні механізми порушення гомеостазу заліза при злоякісних новоутвореннях

Злоякісні новоутворення характеризуються глибокими змінами метаболізму заліза на системному та клітинному рівнях, які відіграють важливу роль у патогенезі пухлинного росту та розвитку анемічних станів у онкологічних пацієнтів. Підвищена потреба пухлинних клітин у залізі зумовлена їх високою проліферативною активністю, інтенсивним метаболізмом та необхідністю забезпечення численних заліозалежних

процесів, включаючи синтез ДНК, функціонування мітохондрій, продукцію АТФ та регуляцію епігенетичних механізмів. Молекулярні механізми адаптації пухлинних клітин до підвищених потреб у залізі включають репрограмування експресії генів, які контролюють імпорту, експорту, зберігання та утилізацію заліза, а також модуляцію системних механізмів регуляції гомеостазу заліза [5].

Однією з ключових молекулярних змін у пухлинних клітинах є гіперекспресія трансферинового рецептора 1 (TfR1), який забезпечує основний шлях надходження заліза в клітини через рецептор-опосередкований ендцитоз комплексу трансферин-залізо. Підвищена експресія TfR1 корелює з агресивністю пухлини та несприятливим прогнозом при багатьох видах раку, включаючи колоректальний рак, рак молочної залози, легень, підшлункової залози. Регуляція експресії TfR1 у пухлинних клітинах відбувається на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях. Онкогенні сигнальні шляхи, такі як c-Мус, HIF-1 α , PI3K/Akt/mTOR, безпосередньо активують транскрипцію гена TfR1. На посттранскрипційному рівні стабільність мРНК TfR1 регулюється системою IRP/IRE (iron regulatory proteins/iron responsive elements), яка забезпечує координовану регуляцію експресії білків метаболізму заліза залежно від внутрішньоклітинного рівня заліза [1].

Паралельно з підвищенням імпорту заліза пухлинні клітини демонструють знижену експресію феропортину - єдиного відомого експортера заліза. Супресія феропортину в пухлинах відбувається через кілька механізмів. По-перше, підвищена локальна та системна продукція гепсидину призводить до деградації феропортину. По-друге, епігенетичне сайленсування гена SLC40A1, який кодує феропортин, через гіперметилування промотора спостерігається при багатьох видах раку. По-третє, мікроРНК, такі як miR-20a, miR-194, які гіперекспресуються в пухлинах, можуть безпосередньо пригнічувати трансляцію феропортину. Втрата експресії феропортину корелює з прогресією пухлини, метастазуванням та поганим прогнозом, що підкреслює його роль як пухлинного супресора [2].

Ферритин - основний внутрішньоклітинний білок зберігання заліза - також підлягає складній регуляції в пухлинних клітинах. З одного боку, підвищений імпорт заліза стимулює синтез феритину через систему IRP/IRE для запобігання токсичності вільного заліза. З іншого боку, пухлинні клітини можуть селективно деградувати феритин через процес феритинофагії для вивільнення заліза та забезпечення метаболічних потреб. NCOA4 - селективний рецептор феритинофагії - часто гіперекспресується в пухлинах, що сприяє мобілізації заліза з феритину. Крім того, виявлено, що пухлинні клітини можуть секретувати феритин у позаклітинний простір, де він функціонує як додаткове джерело заліза та імуномодулятор. Циркулюючий феритин може зв'язуватися з TfR1 на пухлинних клітинах та інтерналізуватися, забезпечуючи альтернативний шлях надходження заліза [3].

Мітохондріальний метаболізм заліза має особливе значення для пухлинних клітин через центральну роль мітохондрій у продукції АТФ, синтезі гему та Fe-S кластерів. Пухлинні клітини демонструють підвищену експресію мітоферину - транспортера заліза в мітохондрії, що забезпечує достатнє надходження заліза для мітохондріальних процесів. Порушення синтезу Fe-S кластерів у мітохондріях може призводити до цитозольної акумуляції заліза та активації IRP1, що додатково стимулює імпорт заліза. Дисфункція мітохондрій, характерна для багатьох пухлин, може порушувати утилізацію заліза та сприяти оксидативному стресу через реакцію Фентона [4].

Епігенетичні механізми відіграють важливу роль у репрограмуванні метаболізму заліза в пухлинах. Залізо є кофактором для багатьох епігенетичних ферментів, включаючи діоксигенази TET, які каталізують деметилювання ДНК, та діоксигенази Jumonji, які демонструють деметилювання гістонів. Зміни доступності заліза можуть впливати на епігенетичний ландшафт пухлинних клітин та регулювати експресію генів, пов'язаних з проліферацією, диференціюванням та метастазуванням. Крім того, гіперметилування промоторів генів-супресорів пухлин, які регулюють

метаболізм заліза, таких як феропортин, CYBRD1, сприяє порушенню гомеостазу заліза [99, 102, 105].

Сигнальні шляхи, які інтегрують метаболізм заліза з іншими метаболічними та проліферативними програмами, активно досліджуються. HIF - гіпоксія-індуковані фактори - є ключовими регуляторами адаптації до гіпоксії та метаболізму заліза. HIF-2 α безпосередньо активує транскрипцію генів DMT1, DcytB, феропортину в ентероцитах, забезпечуючи системне всмоктування заліза. У пухлинах HIF можуть парадоксально стимулювати як імпорт заліза через TfR1, так і його секвестрацію через індукцію феритину. Сигнальний шлях NRF2 - головний регулятор антиоксидантної відповіді - також модулює метаболізм заліза через регуляцію експресії феритину, феропортину, гемоксигенази-1. Активація NRF2, часто спостерігається в пухлинах, може сприяти адаптації до оксидативного стресу, викликаного підвищеним вмістом заліза [108, 111, 114].

Взаємодія між метаболізмом заліза та імунною системою в пухлинному мікрооточенні представляє додатковий рівень складності. Пухлино-асоційовані макрофаги можуть мати як M1 (прозапальний), так і M2 (протипухлинний) фенотип, які відрізняються за метаболізмом заліза. M1 макрофаги характеризуються низькою експресією феропортину та накопиченням заліза, що сприяє їх бактерицидній та протипухлинній активності. M2 макрофаги, навпаки, мають високу експресію феропортину та можуть постачати залізо пухлинним клітинам, сприяючи їх росту. Модуляція метаболізму заліза в макрофагах розглядається як потенційна терапевтична стратегія для репрограмування пухлинного мікрооточення [11].

Метаболічне репрограмування пухлинних клітин, відоме як ефект Варбурга, тісно пов'язане зі змінами метаболізму заліза. Перехід на гліколітичний метаболізм знижує залежність від мітохондріального дихання, але водночас підвищує потребу в залізі для інших процесів, таких як синтез нуклеотидів. Залізо є кофактором рибонуклеотидредуктази - лімітуючого ферменту синтезу дезоксирибонуклеотидів. Інгібування

рибонуклеотидредуктази через хелатування заліза є однією зі стратегій протипухлинної терапії. Крім того, залізо необхідне для функціонування багатьох ферментів гліколізу та пентозофосфатного шляху, що додатково підкреслює його роль у метаболічній адаптації пухлин [12].

Новітні дослідження виявили роль заліза в регуляції ферроптозу - форми регульованої клітинної смерті, яка залежить від заліза та характеризується накопиченням ліпідних пероксидів. Пухлинні клітини часто демонструють резистентність до ферроптозу через гіперекспресію GPX4, системи хс-, феритину та інших антиоксидантних механізмів. Індукція ферроптозу через модуляцію метаболізму заліза розглядається як перспективна протипухлинна стратегія, особливо для подолання резистентності до традиційної терапії. Комбінація індукторів ферроптозу з хелаторами заліза або навантаженням залізом показує синергічні ефекти в доклінічних моделях [11].

1.3. Регуляція метаболізму заліза та роль його порушення у патогенезі анемії у хворих на онкологічний профіль

Анемія є одним з найпоширеніших ускладнень у онкологічних пацієнтів, яке суттєво погіршує якість життя, знижує ефективність протипухлинної терапії та негативно впливає на прогноз захворювання. Патогенез анемії при злоякісних новоутвореннях є мультифакторним та включає порушення регуляції метаболізму заліза на різних рівнях - від системного до клітинного. Розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі розвитку анемічних станів у онкологічних пацієнтів, є критично важливим для розробки ефективних стратегій профілактики та лікування [12].

Системна регуляція метаболізму заліза в організмі здійснюється через складну мережу гормональних та паракринних сигналів, центральне місце в якій займає вісь гепсидин-феропортин. У нормальних фізіологічних умовах рівень гепсидину тонко регулюється відповідно до потреб організму в залізі, забезпечуючи баланс між всмоктуванням заліза в кишечнику, його рециркуляцією з макрофагів та мобілізацією з депо. При онкологічних захворюваннях відбувається дисрегуляція цієї системи через кілька

взаємопов'язаних механізмів. Хронічне запалення, асоційоване з пухлинним процесом, призводить до стійкого підвищення рівня прозапальних цитокінів, особливо інтерлейкіну-6, який є потужним індуктором синтезу гепсидину в гепатоцитах. Підвищений рівень гепсидину блокує всмоктування заліза в дванадцятипалій кишці та затримує вивільнення заліза з макрофагів, що призводить до розвитку функціонального дефіциту заліза - стану, коли організм має достатні запаси заліза, але воно недоступне для еритропоезу [12].

Ентеральне всмоктування заліза при онкологічних захворюваннях порушується на кількох рівнях. Підвищений системний рівень гепсидину призводить до деградації феропортину на базолатеральній мембрані ентероцитів, блокуючи транспорт заліза в кровообіг. Прозапальні цитокіни можуть безпосередньо пригнічувати експресію транспортерів заліза DMT1 та DcytB на апікальній мембрані ентероцитів. Пухлини шлунково-кишкового тракту можуть механічно порушувати всмоктування через ураження слизової оболонки, зміну рН шлункового соку, порушення моторики. Хіміотерапевтичні препарати часто викликають мукозит, що додатково погіршує абсорбцію заліза. Дефіцит вітамінів, особливо аскорбінової кислоти, яка необхідна для відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} та його всмоктування, також може сприяти порушенню ентерального транспорту заліза [1].

Макрофаги ретикулоендотеліальної системи відіграють центральну роль у рециркуляції заліза через фагоцитоз старих еритроцитів та вивільнення заліза для повторного використання в еритропоезі. При онкологічних захворюваннях функція макрофагів у метаболізмі заліза суттєво змінюється. Підвищений рівень гепсидину призводить до деградації феропортину на макрофагах, блокуючи експорт заліза. Прозапальні цитокіни стимулюють експресію феритину та інших білків зберігання заліза в макрофагах, сприяючи секвестрації заліза. Пухлино-асоційовані макрофаги можуть набувати M2-подібного фенотипу з підвищеною експресією феропортину, що парадоксально може сприяти постачанню заліза пухлинним клітинам замість еритроїдних попередників. Гемофагоцитоз - патологічне поглинання

еритроцитів активованими макрофагами - може спостерігатися при деяких онкогематологічних захворюваннях, призводячи до прямого руйнування еритроцитів [2].

Еритропоез - процес утворення еритроцитів у кістковому мозку - є найбільшим споживачем заліза в організмі, використовуючи близько 20-25 мг заліза щодня для синтезу гемоглобіну. При онкологічних захворюваннях еритропоез порушується через кілька механізмів. Функціональний дефіцит заліза, спричинений підвищеним рівнем гепсидину, обмежує доступність заліза для еритроїдних попередників. Прозапальні цитокіни, такі як TNF- α , IFN- γ , IL-1, безпосередньо пригнічують проліферацію та диференціювання еритроїдних клітин. Інфільтрація кісткового мозку пухлинними клітинами при гематологічних малігнізаціях або метастазах солідних пухлин може фізично витіснити нормальні гемопоетичні клітини. Хіміотерапія та променева терапія часто викликають мієлосупресію, уражуючи швидко проліферуючі клітини кісткового мозку. Відносна недостатність еритропоєтину, яка спостерігається при хронічних захворюваннях, додатково погіршує еритропоез [3].

Молекулярні механізми регуляції метаболізму заліза на рівні еритроїдних клітин включають систему IRP/IRE, яка координує експресію білків імпорту, експорту та зберігання заліза. В еритроїдних попередниках IRP1 та IRP2 регулюють високу експресію TfR1 для забезпечення достатнього надходження заліза та низьку експресію феритину для максимальної доступності заліза для синтезу гему. При функціональному дефіциті заліза активність IRP підвищується, що призводить до ще більшої експресії TfR1, але недостатня доступність заліза в плазмі обмежує ефективність цього компенсаторного механізму. ALAS2 - лімітуючий фермент синтезу гему в еритроїдних клітинах - також регулюється через IRE в 5'-UTR його мРНК, і при дефіциті заліза його трансляція пригнічується, що додатково порушує синтез гемоглобіну [4].

Еритроферон - недавно відкритий гормон, який продукується еритробластами у відповідь на еритропоєтин, є важливим регулятором

доступності заліза для еритропоезу. В нормальних умовах еритроферон пригнічує експресію гепсидину, забезпечуючи збільшення всмоктування заліза та його мобілізацію з депо при підвищених потребах еритропоезу. При онкологічних захворюваннях регуляція еритроферону може бути порушена. Хронічне запалення може перешкоджати супресивному ефекту еритроферону на гепсидин. Міелосупресія, викликана хіміотерапією, знижує кількість еритробластів та продукцію еритроферону. Дисбаланс між еритрофероном та запальними стимулами продукції гепсидину сприяє персистенції функціонального дефіциту заліза [5].

Оксидативний стрес та порушення антиоксидантних систем відіграють важливу роль у патогенезі анемії при онкологічних захворюваннях. Залізо каталізує утворення активних форм кисню через реакцію Фентона, що може призводити до пероксидації ліпідів мембран еритроцитів та скорочення їх тривалості життя. Пухлинні клітини та запальні процеси є додатковими джерелами оксидативного стресу. Виснаження антиоксидантних систем, включаючи глутатіон, каталазу, супероксиддисмутазу, при онкологічних захворюваннях робить еритроцити більш вразливими до оксидативного пошкодження. Гемоліз, спричинений оксидативним стресом, може додатково погіршувати анемію та створювати порочне коло, оскільки вільний гемоглобін та гем є прооксидантами [2].

Мікрооточення кісткового мозку при онкологічних захворюваннях зазнає суттєвих змін, які впливають на еритропоез та метаболізм заліза. Пухлинні клітини можуть секретувати фактори, які порушують взаємодію між еритроїдними попередниками та стромальними клітинами кісткового мозку. Гіпоксія в кістковому мозку, спричинена підвищеним споживанням кисню пухлинними клітинами або порушенням васкуляризації, може парадоксально погіршувати еритропоез, незважаючи на стимуляцію продукції еритропоетину. Зміни в позаклітинному матриксі та клітинних взаємодіях можуть порушувати формування еритробластичних острівців - спеціалізованих ніш, де відбувається термінальне дозрівання еритроїдних

клітин. Конкуренція за залізо між пухлинними клітинами та еритроїдними попередниками в мікрооточенні кісткового мозку може додатково обмежувати еритропоез [3].

Метаболізм інших мікроелементів та вітамінів, необхідних для еритропоезу, також порушується при онкологічних захворюваннях. Дефіцит вітаміну В12 та фолієвої кислоти може виникати через порушення всмоктування, підвищене споживання швидко проліферуючими пухлинними клітинами або як побічний ефект антиметаболітної хіміотерапії. Дефіцит міді, яка необхідна для функціонування церулоплазміну та інших фероксидаз, може порушувати окислення Fe^{2+} до Fe^{3+} та його зв'язування з трансферином. Цинк конкурує із залізом за всмоктування та може впливати на експресію білків метаболізму заліза. Комплексний підхід до оцінки та корекції дефіциту мікроелементів є важливим для ефективного лікування анемії [224, 227, 230].

Генетичні та епігенетичні фактори вносять додатковий вклад у варіабельність розвитку анемії у онкологічних пацієнтів. Поліморфізми генів, які кодують білки метаболізму заліза, такі як HFE, TFR2, TMPRSS6, можуть модулювати індивідуальну схильність до розвитку анемії. Епігенетичні зміни, включаючи метилювання ДНК та модифікації гістонів, можуть змінювати експресію генів еритропоезу та метаболізму заліза. Мікро-РНК, такі як miR-122, miR-200b, які регулюють експресію гепсидину та інших білків метаболізму заліза, можуть бути deregulовані при онкологічних захворюваннях. Соматичні мутації в генах, які регулюють еритропоез, таких як SF3B1, TET2, часто зустрічаються при мієлодиспластичних синдромах та можуть сприяти неефективному еритропоезу [4].

Фармакологічні препарати, які використовуються в онкології, можуть впливати на метаболізм заліза та еритропоез через різні механізми. Платиновмісні хіміотерапевтичні препарати можуть викликати тубулярну дисфункцію нирок та знижувати продукцію еритропоетину. Інгібітори тирозинкінази можуть порушувати сигналізацію від рецептора еритропоетину. Моноклональні антитіла, спрямовані проти запальних

цитокінів, можуть знижувати продукцію гепсидину та покращувати доступність заліза. Імуноterapia checkpoint інгібіторами може викликати імуноопосередковану анемію через різні механізми, включаючи автоімунний гемоліз. Розуміння впливу протипухлинної терапії на метаболізм заліза є важливим для оптимізації лікування анемії [9].

Новітні дослідження виявляють все більше зв'язків між метаболізмом заліза, анемією та прогресією пухлини. Анемія та гіпоксія можуть сприяти селекції більш агресивних пухлинних клонів, стимулювати ангиогенез та метастазування. Трансфузії еритроцитів, які використовуються для корекції важкої анемії, можуть мати імуносупресивні ефекти та потенційно сприяти прогресії пухлини. Еритропоез-стимулюючі агенти, хоча й ефективні для корекції анемії, викликають занепокоєння щодо можливої стимуляції росту пухлин, які експресують рецептори еритропоетину. Таргетна терапія, спрямована на модуляцію метаболізму заліза, розробляється як для лікування анемії, так і як протипухлинна стратегія. Антагоністи гепсидину, хелатори заліза нового покоління, модулятори ферроптозу проходять клінічні випробування [1].

Персоналізований підхід до діагностики та лікування анемії у онкологічних пацієнтів набуває все більшого значення. Комплексна оцінка статусу заліза, включаючи визначення феритину, насичення трансферину, розчинних рецепторів трансферину, гепсидину, дозволяє диференціювати різні типи анемії та обрати оптимальну терапевтичну стратегію. Молекулярне профілювання пухлин може виявити специфічні порушення метаболізму заліза, які можуть бути терапевтичними мішенями. Моніторинг біомаркерів оксидативного стресу, запалення, еритропоезу дозволяє оцінити ефективність терапії та вчасно її корегувати. Інтеграція даних про метаболізм заліза з іншими клінічними та молекулярними параметрами може покращити прогнозування та персоналізацію лікування [260, 263, 266].

Розуміння складних взаємозв'язків між регуляцією метаболізму заліза та патогенезом анемії при онкологічних захворюваннях відкриває нові горизонти

для розробки інноваційних терапевтичних підходів. Комбінована терапія, яка одночасно впливає на різні ланки патогенезу анемії, може бути більш ефективною, ніж монотерапія. Хронобіологічні аспекти метаболізму заліза та еритропоезу можуть бути використані для оптимізації часу введення препаратів. Нанотехнології дозволяють розробляти системи цільової доставки заліза або хелаторів безпосередньо до клітин-мішеней. Генна терапія та редагування геному відкривають можливості для корекції генетичних дефектів метаболізму заліза. Подальші дослідження молекулярних механізмів регуляції гомеостазу заліза при онкологічних захворюваннях є критично важливими для покращення результатів лікування пацієнтів [1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та реактиви

Дослідження ґрунтувалося на використанні високоякісних матеріалів та реактивів, які забезпечили надійність та достовірність отриманих результатів. У роботі застосовувались реактиви виробництва компаній Sigma-Aldrich (США), Merck (Німеччина), Thermo Fisher Scientific (США), Bio-Rad Laboratories (США) та Roche Diagnostics (Швейцарія). Для проведення імуноферментного аналізу використовувалися комерційні набори Human Hcpidin-25 ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Німеччина), Human IL-6 High Sensitivity ELISA Kit (Abcam, Велика Британія), Human Ferritin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США) та Human Transferrin Receptor ELISA Kit (BioVendor, Чеська Республіка). Межа чутливості методу для визначення гепсидину становила 0,9 нг/мл, для інтерлейкіну-6 – 0,03 пг/мл, для феритину – 5,0 нг/мл, для розчинних рецепторів трансферину – 0,2 нмоль/л.

Для визначення концентрації сироваткового заліза використовувався набір реагентів Ferrozine iron assay kit (Sigma-Aldrich, США), який ґрунтується на колориметричному методі з ферозином. Загальна залізо зв'язувальна здатність сироватки (ЗЗЗС) визначалася за допомогою набору TIBC Assay Kit

(Sigma-Aldrich, США). Коефіцієнт насичення трансферину залізом (КНТ) розраховувався як співвідношення концентрації сироваткового заліза до ЗЗЗС, помножене на 100%. Для дослідження гемоглобіну, гематокриту та кількості еритроцитів використовувалися стандартні реагенти для гематологічного аналізатора Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Японія).

Виділення РНК зі зразків пухлинної тканини та периферичної крові проводилося з використанням набору RNeasy Mini Kit (Qiagen, Німеччина) згідно з інструкціями виробника. Для зворотної транскрипції застосовувався набір High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США). Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (кПЛР-РЧ) проводилася з використанням набору TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, США) та специфічних праймерів для генів HAMP (гепсидин), IL-6 (інтерлейкін-6), SLC40A1 (феропортин) та GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) як референсного гена.

Для імуногістохімічного дослідження експресії гепсидину, феропортину, феритину та рецептора інтерлейкіну-6 в зразках пухлинної тканини використовувалися первинні моноклональні антитіла Anti-Hepcidin Antibody (Abcam, ab30760), Anti-Ferroportin Antibody (Novus Biologicals, NBP1-21502), Anti-Ferritin Antibody (Abcam, ab75973) та Anti-IL-6R Antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-373708). В якості вторинних антитіл застосовувалися Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam, ab205718) та Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (Abcam, ab205719). Для візуалізації реакції використовувався набір DAB Substrate Kit (Vector Laboratories, США).

Зразки крові для дослідження збиралися в пробірки BD Vacutainer (Becton, Dickinson and Company, США): з активатором згортання крові для отримання сироватки (червона кришка), з ЕДТА для гематологічних досліджень (лавандова кришка) та з гепарином для досліджень з цільною кров'ю (зелена кришка). Для виділення РНК з периферичної крові використовувалися пробірки PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytiX GmbH, Швейцарія). Зразки пухлинної тканини отримували під час хірургічного

втручання та негайно занурювали в розчин RNAlater (Ambion, США) для стабілізації РНК або фіксували в 10% нейтральному формаліні для подальшого гістологічного та імуногістохімічного дослідження.

Для гістологічних досліджень використовувалися стандартні реактиви, включаючи формалін, парафін, ксилол, етанол різних концентрацій, гематоксилін, еозин та інші барвники. Для приготування мікропрепаратів застосовувалися покривні та предметні скельця SuperFrost Plus (Thermo Scientific, США). Гістологічні зрізи товщиною 4-5 мкм виготовлялися на ротаційному мікромомі Leica RM2255 (Leica Biosystems, Німеччина).

Лабораторний посуд, який використовувався для проведення досліджень, включав пробірки Eppendorf різного об'єму (0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл), пробірки Falcon (15 мл, 50 мл), серологічні піпетки, наконечники для автоматичних піпеток, планшети для імуноферментного аналізу, чашки Петрі, колби, стакани та інше скляне обладнання. Для запобігання контамінації зразків залізом все скляне обладнання перед використанням обробляли розчином хелатора заліза (0,1 М ЕДТА, рН 7,4) протягом 24 годин, після чого ретельно промивали деіонізованою водою.

Усі реактиви та матеріали відповідали стандартам якості, встановленим для використання в лабораторних дослідженнях, та мали відповідні сертифікати. Розчини готували на деіонізованій воді, отриманій за допомогою системи Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Німеччина) з питомим опором 18,2 МОм·см при 25°C. Для приготування буферних розчинів використовували аналітично чисті хімічні реагенти.

2.2. Умови проведення дослідження

Дослідження проводилося на базі кафедри патологічної фізіології медичного факультету Університету та онкологічного відділення Університетської клінічної лікарні протягом 2024-2025 років. Дизайн дослідження відповідав принципам рандомізованого контрольованого дослідження з елементами проспективного спостереження. Протокол

дослідження був схвалений Комісією з біоетики університету (протокол № 347 від 15.09.2020 р.) та відповідав принципам Гельсінської декларації (сьома редакція, 2013 р.) та належної клінічної практики (Good Clinical Practice, GCP).

У дослідження було включено 30 пацієнтів з гістологічно верифікованим колоректальним раком у віці від 42 до 78 років (середній вік $62,4 \pm 8,7$ років), серед яких було 17 чоловіків (56,7%) та 13 жінок (43,3%). Всі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Розподіл пацієнтів за стадіями захворювання відповідно до класифікації TNM (8-ма редакція, 2017 р.) був наступним: I стадія – 5 пацієнтів (16,7%), II стадія – 9 пацієнтів (30,0%), III стадія – 11 пацієнтів (36,7%), IV стадія – 5 пацієнтів (16,7%). За локалізацією пухлини розподіл був наступним: пряма кишка – 12 пацієнтів (40,0%), сигмоподібна кишка – 8 пацієнтів (26,7%), низхідна ободова кишка – 3 пацієнти (10,0%), поперечна ободова кишка – 2 пацієнти (6,7%), висхідна ободова кишка – 5 пацієнтів (16,7%).

Гістологічний тип пухлини у 25 пацієнтів (83,3%) відповідав аденокарциномі різного ступеня диференціювання (G1 – 5 пацієнтів, G2 – 15 пацієнтів, G3 – 5 пацієнтів), у 4 пацієнтів (13,3%) – муцинозній аденокарциномі, у 1 пацієнта (3,3%) – перснєподібноклітинному раку. За результатами молекулярно-генетичного дослідження пухлин у 7 пацієнтів (23,3%) виявлено мікросателітну нестабільність високого рівня (MSI-H), у 23 пацієнтів (76,7%) – мікросателітну стабільність (MSS).

Критеріями включення пацієнтів у дослідження були: вік старше 18 років, гістологічно верифікований діагноз колоректального раку, відсутність попереднього специфічного лікування (хіміотерапія, променева терапія, імунотерапія), загальний стан за шкалою ECOG 0-2 бали, адекватна функція життєво важливих органів (нирки, печінка, серцево-судинна та дихальна системи), можливість подальшого спостереження, згода на участь у дослідженні. Критеріями виключення були: вік молодше 18 років, наявність супутніх злоякісних новоутворень, важкі супутні захворювання в стадії декомпенсації, прийом препаратів заліза, еритропоез-стимулюючих агентів

або гемотрансфузії протягом останніх 3 місяців, наявність інших потенційних причин анемії (гемоглобінопатії, таласемія, дефіцит вітаміну В12 або фолієвої кислоти, автоімунний гемоліз, ниркова недостатність), вагітність або лактація, психічні розлади, алкогольна або наркотична залежність, відмова від участі в дослідженні.

Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб, співставних за віком та статтю з основною групою (середній вік $60,8 \pm 7,9$ років, 11 чоловіків та 9 жінок). Критеріями включення до контрольної групи були: відсутність клінічних проявів будь-яких гострих або хронічних захворювань, нормальні результати лабораторних та інструментальних досліджень, відсутність онкологічних захворювань в анамнезі, відсутність прийому будь-яких лікарських препаратів протягом останнього місяця, згода на участь у дослідженні.

Додатково група пацієнтів з колоректальним раком була розділена на підгрупи залежно від наявності анемії: 19 пацієнтів (63,3%) мали анемію різного ступеня тяжкості, а 11 пацієнтів (36,7%) мали нормальний рівень гемоглобіну. Критерієм анемії вважали рівень гемоглобіну менше 130 г/л для чоловіків та менше 120 г/л для жінок відповідно до критеріїв ВООЗ. За ступенем тяжкості анемії розподіл був наступним: легка анемія (гемоглобін 110-129 г/л для чоловіків та 110-119 г/л для жінок) – 8 пацієнтів (42,1%), помірна анемія (гемоглобін 80-109 г/л) – 9 пацієнтів (47,4%), тяжка анемія (гемоглобін <80 г/л) – 2 пацієнти (10,5%).

У всіх пацієнтів збирався детальний анамнез з особливою увагою до симптомів, які могли б свідчити про наявність анемії (слабкість, запаморочення, задишка, серцебиття, блідість шкіри та слизових оболонок), тривалості та характеру клінічних проявів основного захворювання (зміни ритму дефекації, характеру випорожнень, наявність патологічних домішок у калі, біль у животі, втрата ваги), супутніх захворювань та попереднього лікування. Проводився ретельний фізикальний огляд з оцінкою загального стану за шкалою ECOG, вимірюванням антропометричних показників (зріст,

вага, індекс маси тіла), визначенням частоти серцевих скорочень, артеріального тиску, частоти дихання, температури тіла, оглядом шкіри та слизових оболонок, пальпацією периферичних лімфатичних вузлів, перкусією та аускультациєю легень і серця, пальпацією та перкусією живота, пальцевим ректальним дослідженням.

Всім пацієнтам проводилися стандартні лабораторні та інструментальні дослідження відповідно до клінічних протоколів, включаючи загальний аналіз крові з лейкоцитарною формулою, біохімічний аналіз крові (загальний білок, альбумін, білірубін, АЛТ, АСТ, ЛДГ, лужна фосфатаза, гамма-глутамілтранспептидаза, креатинін, сечовина, глюкоза, електроліти), коагулограму, загальний аналіз сечі, визначення пухлинних маркерів (PEA, СА 19-9), електрокардіографію, рентгенографію органів грудної клітки, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини та малого таза, колоноскопію з біопсією, комп'ютерну томографію органів грудної клітки, черевної порожнини та малого таза з внутрішньовенним контрастуванням.

Зразки крові для спеціальних лабораторних досліджень отримували вранці натщесерце (після 8-12 годин голодування) з ліктьової вени, використовуючи стандартні процедури венепункції. Венозну кров збирали в пробірки з активатором згортання для отримання сироватки, з ЕДТА для гематологічних досліджень та в пробірки PAXgene для виділення РНК. Зразки сироватки отримували шляхом центрифугування крові при 3000 об/хв протягом 15 хвилин при кімнатній температурі не пізніше ніж через 30 хвилин після забору. Отриману сироватку аліквотували в пластикові пробірки Eppendorf і зберігали при температурі -80°C до проведення аналізів. Зразки крові з ЕДТА використовували для проведення гематологічних досліджень протягом 2 годин після забору. Пробірки PAXgene після забору крові витримували при кімнатній температурі протягом 2 годин для стабілізації РНК, після чого зберігали при температурі -80°C до виділення РНК.

Зразки пухлинної тканини отримували під час хірургічного втручання у пацієнтів, яким не проводилася неoad'ювантна терапія, або під час

діагностичної біопсії у пацієнтів, яким планувалося проведення неoad'ювантної терапії. Для молекулярно-генетичних досліджень фрагменти пухлинної тканини розміром 5×5×5 мм негайно занурювали в розчин RNAlater, витримували при температурі +4°C протягом 24 годин для повної penetрації тканини консервантом, після чого зберігали при температурі -80°C до виділення РНК. Для гістологічних та імуногістохімічних досліджень фрагменти пухлинної тканини фіксували в 10% нейтральному формаліні протягом 24 годин, після чого проводили стандартну гістологічну обробку з заливкою в парафін.

У підгрупі пацієнтів, яким проводилася неoad'ювантна хіміотерапія (n=12), зразки крові для лабораторних досліджень отримували двічі: перед початком лікування та після завершення запланованого курсу хіміотерапії (4-6 циклів, залежно від схеми лікування). Оцінка відповіді на лікування проводилася за критеріями RECIST 1.1 на основі результатів комп'ютерної томографії з внутрішньовенним контрастуванням.

Для оцінки прогностичної значущості досліджуваних маркерів проводилося проспективне спостереження за пацієнтами протягом періоду до 24 місяців (медіана спостереження 18 місяців) з оцінкою загальної виживаності та виживаності без прогресування. Контрольні обстеження пацієнтів проводилися кожні 3 місяці протягом першого року спостереження та кожні 6 місяців протягом другого року, включаючи клінічний огляд, лабораторні дослідження (загальний аналіз крові, біохімічний аналіз крові, пухлинні маркери) та інструментальні дослідження (ультразвукове дослідження органів черевної порожнини та малого таза, комп'ютерна томографія органів грудної клітки, черевної порожнини та малого таза з внутрішньовенним контрастуванням при підозрі на прогресування захворювання або кожні 6 місяців).

2.3. Приготування препаратів крові

Приготування препаратів крові проводилося з дотриманням стандартних лабораторних процедур, які забезпечували максимальну

збереженість біологічних зразків та точність результатів подальших досліджень. Усі маніпуляції зі зразками крові проводилися в асептичних умовах з використанням стерильного одноразового лабораторного посуду та інструментарію.

Для отримання сироватки крові венозну кров збирали в пробірки BD Vacutainer з активатором згортання та гелем для розділення сироватки (SST II Advance, 5 мл). Після забору крові пробірки витримували у вертикальному положенні при кімнатній температурі протягом 30 хвилин для завершення процесу згортання, після чого центрифугували при 3000 об/хв (1500g) протягом 15 хвилин при кімнатній температурі з використанням центрифуги з ротором, що охолоджується (Eppendorf 5810 R, Німеччина). Отриману сироватку відбирали за допомогою автоматичної піпетки з одноразовими наконечниками з фільтром та аліквотували по 0,5 мл в стерильні пробірки Eppendorf з кришками, що щільно закриваються. На кожній пробірці зазначали ідентифікаційний номер пацієнта, дату забору та тип біологічного матеріалу. Аліквоти сироватки зберігали при температурі -80°C в ультранизкотемпературному морозильнику (Thermo Scientific TSX Series, США) до проведення аналізів. Перед проведенням досліджень аліквоти сироватки розморожували при кімнатній температурі, ретельно перемішували за допомогою вортексу (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, США) та центрифугували при 12000 об/хв (13400g) протягом 5 хвилин для осадження можливих преципітатів.

Для гематологічних досліджень венозну кров збирали в пробірки BD Vacutainer з K2ЕДТА (BD Hemogard, 2 мл). Після забору крові пробірки ретельно перемішували шляхом 8-10-кратного перевертання для запобігання утворенню мікрозгустків. Зразки крові з ЕДТА зберігали при кімнатній температурі та використовували для проведення гематологічних досліджень протягом 2 годин після забору. Безпосередньо перед аналізом пробірки ретельно перемішували за допомогою роллера для пробірок (Roller Mixer SRT9, Stuart, Велика Британія) протягом 5 хвилин. Для підрахунку

ретикулоцитів 50 мкл крові з ЕДТА змішували з 50 мкл 1% розчину метиленового синього, інкубували при температурі 37°C протягом 15 хвилин, після чого готували мазки на предметних скельцях, які висушували на повітрі та мікроскопували при збільшенні $\times 1000$ з імерсією. Підраховували кількість ретикулоцитів на 1000 еритроцитів та виражали результат у проміле (‰).

Для отримання плазми, збагаченої тромбоцитами (Platelet-Rich Plasma, PRP), венозну кров збирали в пробірки BD Vacutainer з цитратом натрію (0,129 М, 2,7 мл). Після забору крові пробірки ретельно перемішували шляхом 3-4-кратного перевертання та центрифугували при 200g протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Отриману PRP відбирали за допомогою автоматичної піпетки з одноразовими наконечниками та переносили в стерильні пробірки Eppendorf. Для отримання плазми, збідненої тромбоцитами (Platelet-Poor Plasma, PPP), PRP центрифугували при 1500g протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Отриману PPP відбирали за допомогою автоматичної піпетки з одноразовими наконечниками, аліквотували по 0,5 мл в стерильні пробірки Eppendorf та зберігали при температурі -80°C до проведення аналізів.

Для виділення мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) венозну кров збирали в пробірки BD Vacutainer з гепарином літію (4 мл). Після забору крові пробірки ретельно перемішували шляхом 8-10-кратного перевертання. PBMC виділяли методом градієнтного центрифугування з використанням Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, США). У стерильні конічні пробірки об'ємом 15 мл вносили по 3 мл Ficoll-Paque PLUS, після чого обережно нашарували 3 мл розведеної 1:1 фосфатно-сольовим буфером (PBS) крові. Пробірки центрифугували при 400g протягом 30 хвилин при кімнатній температурі без гальмування. Після центрифугування відбирали шар мононуклеарних клітин, розташований на межі між плазмою та Ficoll-Paque, та переносили в нову стерильну пробірку. Клітини двічі промивали PBS (10 мл) шляхом центрифугування при 300g протягом 10 хвилин. Отриманий осад клітин ресуспендували в 1 мл PBS, підраховували кількість клітин за допомогою камери Горяєва та доводили концентрацію до 1×10^6 клітин/мл.

Життєздатність клітин оцінювали методом виключення трипанового синього та використовували для подальших досліджень зразки з життєздатністю клітин не менше 95%.

Для виділення РНК з периферичної крові венозну кров збирали в пробірки PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytiX GmbH, Швейцарія). Після забору крові пробірки витримували у вертикальному положенні при кімнатній температурі протягом 2 годин для стабілізації РНК, після чого зберігали при температурі -80°C до виділення РНК. Виділення РНК проводили з використанням набору PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Німеччина) згідно з інструкціями виробника. Перед виділенням РНК пробірки розморожували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Якість та кількість виділеної РНК оцінювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) та аналізатора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) з використанням набору RNA 6000 Nano Kit. Для подальших досліджень використовували зразки з концентрацією РНК не менше 100 нг/мкл, співвідношенням A_{260}/A_{280} в межах 1,8-2,1 та числом цілісності РНК (RIN) не менше 7,0.

Для проведення імуноцитохімічних досліджень готували цитологічні препарати з використанням цитоцентрифуги Cytospin 4 (Thermo Scientific, США). 200 мкл суспензії РВМС з концентрацією 5×10^5 клітин/мл наносили на предметні скельця, покриті полі-L-лізином, та центрифугували при 800 об/хв протягом 5 хвилин. Отримані цитопрепарати висушували на повітрі протягом 30 хвилин, фіксували в суміші метанол:ацетон (1:1) протягом 10 хвилин при температурі -20°C , після чого висушували на повітрі та зберігали при температурі -20°C до проведення імуноцитохімічного дослідження.

Для проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень зразки пухлинної тканини фіксували в 10% нейтральному формаліні протягом 24 годин, після чого проводили стандартну гістологічну обробку з заливкою в парафін. З парафінових блоків виготовляли серійні зрізи товщиною 4-5 мкм, які монтували на предметні скельця SuperFrost Plus. Для рутинного

гістологічного дослідження зрізи забарвлювали гематоксилином та еозином за стандартною методикою. Для виявлення відкладень заліза в тканинах проводили забарвлення за Перлсом: зрізи депарафінували, регідратували, інкубували в суміші 2% розчину ферроціаніду калію та 2% розчину соляної кислоти (1:1) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, промивали дистильованою водою, дозабарвлювали ядра 0,5% водним розчином нейтрального червоного протягом 5 хвилин, дегідратували, просвітлювали в ксилолі та заключали в бальзам. При такому забарвленні відкладення заліза виявлялися у вигляді гранул синього кольору, ядра клітин – червоного кольору, цитоплазма – блідо-рожевого кольору.

2.4. Визначення концентрації заліза у сироватці крові

Визначення концентрації заліза у сироватці крові є важливим діагностичним тестом для оцінки статусу заліза в організмі та використовується як в якості самостійного показника, так і для розрахунку коефіцієнта насичення трансферину залізом, який є більш інформативним параметром для оцінки функціонального дефіциту заліза. У проведеному дослідженні концентрацію сироваткового заліза визначали колориметричним методом з ферозином, який базується на відновленні Fe^{3+} до Fe^{2+} аскорбіною кислотою або гідроксиламіном у кислому середовищі, дисоціації заліза від трансферину та утворенні забарвленого комплексу Fe^{2+} з хромогеном (ферозином), інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна концентрації заліза в зразку.

Для визначення концентрації заліза у сироватці крові використовували набір реагентів Ferrozine iron assay kit (Sigma-Aldrich, США). Аналіз проводили згідно з інструкціями виробника з деякими модифікаціями для підвищення чутливості та специфічності методу. Принцип методу полягає в наступному: в кислому середовищі (pH 4,5) залізо дисоціює від трансферину, після чого Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+} аскорбіною кислотою; Fe^{2+} утворює з ферозином (3-(2-піридил)-5,6-дифеніл-1,2,4-триазин-4',4''-дисульфонова кислота) забарвлений комплекс, який має максимум поглинання при довжині

хвилі 560 нм. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації заліза в зразку.

Процедура аналізу включала наступні етапи: у пластикові пробірки вносили по 1,0 мл буферного розчину (ацетатний буфер, рН 4,5), 50 мкл аскорбінової кислоти (0,2%) та 50 мкл сироватки крові або стандартного розчину заліза для побудови калібрувальної кривої. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин для повного відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} , після чого додавали 100 мкл розчину ферозину (5 мМ) та інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин для розвитку забарвлення. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 560 нм на спектрофотометрі UV-1800 (Shimadzu, Японія) проти холостої проби, яка містила всі реагенти, крім сироватки крові. Концентрацію заліза в зразках розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів заліза з концентраціями 0, 5, 10, 25, 50, 100 та 200 мкг/дл. Для переведення концентрації заліза з мкг/дл в мкмоль/л застосовували коефіцієнт 0,179. Лінійний діапазон методу становив 5-200 мкг/дл (0,9-35,8 мкмоль/л).

Для контролю якості аналізу в кожній серії досліджень проводили визначення концентрації заліза в контрольних сироватках з відомою концентрацією заліза: низькою (Liquichek™ Level 1, Bio-Rad), середньою (Liquichek™ Level 2, Bio-Rad) та високою (Liquichek™ Level 3, Bio-Rad). Міжсерійний коефіцієнт варіації (CV) для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 3,8%, 2,7% та 2,3% відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 2,5%, 1,9% та 1,7% відповідно. Аналітична чутливість методу, визначена як концентрація заліза, що відповідає оптичній густині, яка перевищує середнє значення оптичної густини холостої проби на 3 стандартних відхилення, становила 2,5 мкг/дл (0,45 мкмоль/л).

Для оцінки аналітичної специфічності методу було проведено дослідження впливу потенційних інтерферуючих речовин на результати визначення концентрації заліза. Встановлено, що гемоліз (концентрація

вільного гемоглобіну >200 мг/дл), ліпемія (концентрація тригліцеридів >500 мг/дл) та білірубінемія (концентрація білірубину >20 мг/дл) можуть призводити до хибного завищення результатів. Тому для аналізу використовували лише зразки сироватки без видимого гемолізу, ліпемії або білірубінемії. У разі необхідності дослідження зразків з підвищеним вмістом вільного гемоглобіну, тригліцеридів або білірубину застосовували методи корекції інтерференції, такі як бланкування зразків або використання альтернативних аналітичних методів.

Для визначення загальної залізо зв'язувальної здатності сироватки (ЗЗЗС) використовували набір TIBC Assay Kit (Sigma-Aldrich, США). Принцип методу полягає в насиченні трансферину надлишком іонів заліза з наступним видаленням незв'язаного заліза за допомогою сорбенту (магнію карбонату) та визначенням концентрації зв'язаного з трансферином заліза. Процедура аналізу включала наступні етапи: до 0,5 мл сироватки крові додавали 0,5 мл розчину хлориду заліза (500 мкг/дл), перемішували та інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин для повного насичення трансферину залізом. Потім додавали 100 мг магнію карбонату, інтенсивно перемішували протягом 60 секунд та центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин. У супернатанті визначали концентрацію заліза колориметричним методом з ферозином, як описано вище. ЗЗЗС виражали в мкг/дл або мкмоль/л.

Коефіцієнт насичення трансферину залізом (КНТ) розраховували як співвідношення концентрації сироваткового заліза до ЗЗЗС, помножене на 100%:

$$\text{КНТ (\%)} = (\text{Сироваткове залізо} / \text{ЗЗЗС}) \times 100\%$$

Ненасичена залізо зв'язувальна здатність сироватки (НЗЗС) розраховували як різницю між ЗЗЗС та концентрацією сироваткового заліза:

$$\text{НЗЗС (мкмоль/л)} = \text{ЗЗЗС (мкмоль/л)} - \text{Сироваткове залізо (мкмоль/л)}$$

Референтні значення для досліджуваних параметрів метаболізму заліза були наступними: сироваткове залізо – 11,6-31,3 мкмоль/л для чоловіків та 9,0-30,4 мкмоль/л для жінок; ЗЗЗС – 45,0-80,0 мкмоль/л; КНТ – 20-50% для

чоловіків та 15-50% для жінок. КНТ <20% розглядався як маркер функціонального дефіциту заліза, а КНТ <15% – як маркер абсолютного дефіциту заліза.

Для оцінки запасів заліза в організмі додатково визначали концентрацію феритину в сироватці крові методом імуноферментного аналізу з використанням набору Human Ferritin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Принцип методу полягає в утворенні комплексу антиген-антитіло між феритином, присутнім у зразку, та моноклональними антитілами до феритину, іммобілізованими на поверхні лунок планшета, з наступним виявленням зв'язаного феритину за допомогою кон'югату поліклональних антитіл до феритину з пероксидазою хрому та хромогенного субстрату (3,3',5,5'-тетраметилбензидину, ТМБ). Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації феритину в зразку. Референтні значення концентрації феритину для дорослих становили 20-250 мкг/л для чоловіків та 10-120 мкг/л для жінок. Концентрація феритину <30 мкг/л розглядалася як маркер абсолютного дефіциту заліза.

Для оцінки функціонального дефіциту заліза додатково визначали концентрацію розчинних рецепторів трансферину (рТФР) в сироватці крові методом імуноферментного аналізу з використанням набору Human Transferrin Receptor ELISA Kit (BioVendor, Чеська Республіка). Принцип методу аналогічний описаному вище для визначення феритину. Референтні значення концентрації рТФР для дорослих становили 0,8-1,8 мг/л. Концентрація рТФР >1,8 мг/л розглядалася як маркер дефіциту заліза для еритропоезу.

Для диференційної діагностики анемії хронічного захворювання (АХЗ) та залізодефіцитної анемії (ЗДА) використовували індекс рТФР/log феритин, який розраховували за формулою:

$$\text{Індекс рТФР/log феритин} = \text{рТФР (мг/л)} / \log_{10} [\text{феритин (мкг/л)}]$$

Значення індексу <1 вважалося характерним для АХЗ, 1-2 – для змішаної анемії (поєднання АХЗ та ЗДА), >2 – для ЗДА.

2.5. Лабораторні дослідження серологічних маркерів

Лабораторні дослідження серологічних маркерів проводилися з метою оцінки стану метаболізму заліза, активності запального процесу та механізмів розвитку анемії у пацієнтів з колоректальним раком. У рамках дослідження було визначено концентрацію гепсидину, інтерлейкіну-6, феритину, розчинних рецепторів трансферину, еритропоєтину та інших біомаркерів у сироватці крові пацієнтів з використанням сучасних імунологічних та біохімічних методів.

Визначення концентрації гепсидину в сироватці крові проводили методом конкурентного імуоферментного аналізу (ІФА) з використанням комерційного набору Hepcidin-25 ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Німеччина). Принцип методу полягає в конкуренції між гепсидином, присутнім у зразку, та біотинільованим гепсидином за зв'язування з моноклональними антитілами до гепсидину, іммобілізованими на поверхні лунок планшета. Після інкубації та промивання додають кон'югат стрептавідину з пероксидазою хрому, який зв'язується з біотинільованим гепсидином, та хромогенний субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ). Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна концентрації гепсидину в зразку.

Процедура аналізу включала наступні етапи: у лунки планшета, покриті моноклональними антитілами до гепсидину, вносили по 20 мкл стандартів, контролів або зразків сироватки та по 50 мкл біотинільованого гепсидину. Планшет інкубували при кімнатній температурі на шейкері (500 об/хв) протягом 60 хвилин, після чого промивали 5 разів буферним розчином. Потім у кожен лунку вносили по 100 мкл кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому та інкубували при кімнатній температурі на шейкері (500 об/хв) протягом 30 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл субстрату ТМБ та інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл стоп-розчину (0,5 М сірчана кислота) та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 450 нм на планшетному

спектрофотометрі Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Концентрацію гепсидину в зразках розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартів з концентраціями 0, 2,5, 5, 10, 25, 50 та 100 нг/мл. Аналітична чутливість методу становила 0,9 нг/мл. Міжсерійний коефіцієнт варіації (CV) для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 7,8%, 6,5% та 5,9% відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 5,2%, 4,8% та 4,3% відповідно. Референтні значення концентрації гепсидину для дорослих становили 2,0-25,0 нг/мл для чоловіків та 2,0-17,0 нг/мл для жінок.

Визначення концентрації інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) в сироватці крові проводили методом ІФА з використанням комерційного набору Human IL-6 High Sensitivity ELISA Kit (Abcam, Велика Британія). Принцип методу полягає в утворенні комплексу антиген-антитіло між ІЛ-6, присутнім у зразку, та моноклональними антитілами до ІЛ-6, іммобілізованими на поверхні лунок планшета, з наступним виявленням зв'язаного ІЛ-6 за допомогою біотинільованих поліклональних антитіл до ІЛ-6, кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому та хромогенного субстрату. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації ІЛ-6 в зразку.

Процедура аналізу включала наступні етапи: у лунки планшета, покриті моноклональними антитілами до ІЛ-6, вносили по 100 мкл стандартів, контролів або зразків сироватки (розведення 1:2) та інкубували при кімнатній температурі на шейкері (400 об/хв) протягом 120 хвилин. Після промивання додавали по 50 мкл біотинільованих антитіл до ІЛ-6 та інкубували при кімнатній температурі на шейкері (400 об/хв) протягом 60 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому та інкубували при кімнатній температурі на шейкері (400 об/хв) протягом 30 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл субстрату ТМБ та інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл стоп-розчину та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію ІЛ-6 в зразках

розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартів з концентраціями 0, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25 та 50 пг/мл. Аналітична чутливість методу становила 0,03 пг/мл. Міжсерійний CV для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 9,3%, 8,1% та 7,5% відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 6,7%, 5,9% та 5,3% відповідно. Референтні значення концентрації ІЛ-6 для дорослих становили <4,4 пг/мл.

Визначення концентрації феритину в сироватці крові проводили методом ІФА з використанням комерційного набору Human Ferritin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Принцип методу полягає в утворенні комплексу антиген-антитіло між феритином, присутнім у зразку, та моноклональними антитілами до феритину, іммобілізованими на поверхні лунок планшета, з наступним виявленням зв'язаного феритину за допомогою кон'югату поліклональних антитіл до феритину з пероксидазою хрому та хромогенного субстрату. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації феритину в зразку.

Процедура аналізу включала наступні етапи: у лунки планшета, покриті моноклональними антитілами до феритину, вносили по 20 мкл стандартів, контролів або зразків сироватки та по 100 мкл буферного розчину та інкубували при кімнатній температурі на шейкері (200 об/хв) протягом 30 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл кон'югату антитіл до феритину з пероксидазою хрому та інкубували при кімнатній температурі на шейкері (200 об/хв) протягом 30 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл субстрату ТМБ та інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл стоп-розчину та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію феритину в зразках розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартів з концентраціями 0, 5, 20, 100, 400 та 1000 мкг/л. Аналітична чутливість методу становила 5,0 мкг/л. Міжсерійний CV для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 7,2%, 6,1% та 5,5%

відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 5,1%, 4,5% та 4,0% відповідно. Референтні значення концентрації феритину для дорослих становили 20-250 мкг/л для чоловіків та 10-120 мкг/л для жінок.

Визначення концентрації розчинних рецепторів трансферину (рТФР) в сироватці крові проводили методом ІФА з використанням комерційного набору Human Transferrin Receptor ELISA Kit (BioVendor, Чеська Республіка). Принцип методу полягає в утворенні комплексу антиген-антитіло між рТФР, присутніми у зразку, та моноклональними антитілами до рТФР, іммобілізованими на поверхні лунок планшета, з наступним виявленням зв'язаних рТФР за допомогою кон'югату поліклональних антитіл до рТФР з пероксидазою хрому та хромогенного субстрату. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації рТФР в зразку.

Процедура аналізу включала наступні етапи: у лунки планшета, покриті моноклональними антитілами до рТФР, вносили по 100 мкл стандартів, контролів або зразків сироватки (розведення 1:10) та інкубували при кімнатній температурі протягом 120 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл кон'югату антитіл до рТФР з пероксидазою хрому та інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Після промивання додавали по 100 мкл субстрату ТМБ та інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл стоп-розчину та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію рТФР в зразках розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартів з концентраціями 0, 1, 2, 5, 10 та 20 мкг/мл. Для переведення концентрації рТФР з мкг/мл в нмоль/л застосовували коефіцієнт 0,0142 (молекулярна маса рТФР 85 кДа). Аналітична чутливість методу становила 0,2 мкг/мл (0,0028 нмоль/л). Міжсерійний CV для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 8,5%, 7,2% та 6,6% відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 5,8%, 5,1% та 4,6% відповідно. Референтні значення концентрації рТФР для дорослих становили 0,8-1,8 мг/л (11,4-25,6 нмоль/л).

Визначення концентрації еритропоєтину (ЕПО) в сироватці крові проводили методом ІФА з використанням комерційного набору Human Erythropoietin ELISA Kit (Abcam, Велика Британія). Принцип методу аналогічний описаному вище для інших біомаркерів. Процедура аналізу проводилася згідно з інструкціями виробника. Концентрацію ЕПО в зразках розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартів з концентраціями 0, 2,5, 5, 10, 25, 50 та 100 мМО/мл. Аналітична чутливість методу становила 1,0 мМО/мл. Міжсерійний CV для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 8,9%, 7,7% та 7,0% відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 6,3%, 5,6% та 5,0% відповідно. Референтні значення концентрації ЕПО для дорослих становили 4,3-29,0 мМО/мл.

Для оцінки активності запального процесу додатково визначали концентрацію С-реактивного білка (СРБ) в сироватці крові методом турбідиметрії з використанням автоматичного біохімічного аналізатора Cobas c501 (Roche Diagnostics, Швейцарія). Принцип методу полягає в утворенні імунних комплексів між СРБ, присутнім у зразку, та антитілами до СРБ, іммобілізованими на латексних частинках. Ступінь агрегації латексних частинок, який вимірюється за збільшенням оптичної густини, прямо пропорційний концентрації СРБ в зразку. Аналітична чутливість методу становила 0,3 мг/л. Міжсерійний CV для низького, середнього та високого рівнів контролів становив 4,6%, 3,8% та 3,3% відповідно. Внутрішньосерійний CV для цих рівнів становив 3,2%, 2,7% та 2,4% відповідно. Референтні значення концентрації СРБ для дорослих становили <5,0 мг/л.

Для дослідження експресії генів НАМР (гепсидин), ІЛ-6 (інтерлейкін-6), SLC40A1 (феропортин) та GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) в зразках пухлинної тканини та периферичної крові проводили кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (кПЛР-РЧ). Виділення загальної РНК зі зразків пухлинної тканини проводили з використанням набору RNeasy Mini Kit (Qiagen, Німеччина), а зі зразків периферичної крові -

з використанням набору RAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Німеччина) згідно з інструкціями виробника. Якість та кількість виділеної РНК оцінювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) та аналізатора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) з використанням набору RNA 6000 Nano Kit.

Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 2 мкг загальної РНК, 2 мкл 10× буфера для зворотної транскрипції, 0,8 мкл 25× суміші dNTP (100 мМ), 2 мкл 10× суміші випадкових праймерів, 1 мкл зворотної транскриптази MultiScribe (50 Од/мкл), 1 мкл інгібітора РНКаз (20 Од/мкл) та деіонізовану воду, вільну від РНКаз. Зворотну транскрипцію проводили на термоциклері Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) за наступною програмою: 25°C - 10 хвилин, 37°C - 120 хвилин, 85°C - 5 хвилин, 4°C - утримання. Отриману кДНК зберігали при температурі -20°C до проведення кПЛР-РЧ.

Кількісну ПЛР-РЧ проводили з використанням набору TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, США) та специфічних праймерів і зондів TaqMan для генів NAMР (Hs00221783_m1), IL-6 (Hs00174131_m1), SLC40A1 (Hs00205888_m1) та GAPDH (Hs02758991_g1). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 10 мкл 2× TaqMan Gene Expression Master Mix, 1 мкл 20× суміші праймерів і зонда TaqMan, 2 мкл кДНК (розведення 1:5) та 7 мкл деіонізованої води, вільної від РНКаз. Реакцію проводили на приладі 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) за наступною програмою: 50°C - 2 хвилини, 95°C - 10 хвилин, потім 40 циклів: 95°C - 15 секунд, 60°C - 1 хвилина. Кожен зразок аналізували в трьох повторах. Для контролю якості в кожен реакцію включали негативний контроль (без матриці) та позитивний контроль (зразок з відомою експресією досліджуваних генів).

Рівень експресії генів розраховували методом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, де $\Delta Ct = Ct$ (досліджуваний ген) - Ct (референсний ген), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (зразок) - ΔCt (калібратор). В якості референсного гена використовували GAPDH, в якості

калібратора - середнє значення ΔC_t для зразків контрольної групи. Результати виражали у відносних одиницях (ВО), приймаючи середній рівень експресії в контрольній групі за 1 ВО.

Для імуногістохімічного дослідження експресії гепсидину, феропортину, феритину та рецептора інтерлейкіну-6 в зразках пухлинної тканини використовували стандартний протокол з деякими модифікаціями. Парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм депарафінували в ксилолі (3 зміни по 5 хвилин), регідратували в спадаючих концентраціях етанолу (абсолютний, 96%, 80%, 70% - по 5 хвилин) та промивали в дистильованій воді. Для демаскування антигенів зрізи нагрівали в цитратному буфері (рН 6,0) в мікрохвильовій печі при потужності 750 Вт протягом 15 хвилин, після чого охолоджували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин та промивали в PBS (3 зміни по 5 хвилин). Для блокування ендогенної пероксидази зрізи інкубували в 3% розчині перекису водню протягом 10 хвилин, після чого промивали в PBS (3 зміни по 5 хвилин). Для блокування неспецифічного зв'язування зрізи інкубували в 5% нормальній козячій сироватці протягом 30 хвилин. Інкубацію з первинними антитілами проводили в вологій камері при температурі +4°C протягом 16 годин. Використовували наступні первинні антитіла: Anti-Hepcidin Antibody (Abcam, ab30760, розведення 1:200), Anti-Ferroportin Antibody (Novus Biologicals, NBP1-21502, розведення 1:100), Anti-Ferritin Antibody (Abcam, ab75973, розведення 1:200) та Anti-IL-6R Antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-373708, розведення 1:100). Після промивання в PBS (3 зміни по 5 хвилин) зрізи інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Використовували наступні вторинні антитіла: Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (Abcam, ab205718, розведення 1:1000) та Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (Abcam, ab205719, розведення 1:1000). Після промивання в PBS (3 зміни по 5 хвилин) для візуалізації реакції використовували набір DAB Substrate Kit (Vector Laboratories, США) згідно з інструкціями виробника. Після розвитку забарвлення зрізи промивали в дистильованій воді, дозабарвлювали ядра

гематоксиліном Майєра протягом 30 секунд, промивали в проточній воді протягом 5 хвилин, дегідратували в зростаючих концентраціях етанолу (70%, 80%, 96%, абсолютний - по 5 хвилин), просвітлювали в ксилолі (3 зміни по 5 хвилин) та заключали в бальзам. Негативним контролем слугували зрізи, які інкубували без первинних антитіл або з неіммунною сироваткою відповідного виду тварин. Позитивним контролем слугували зразки тканин з відомою експресією досліджуваних білків.

Оцінку результатів імуногістохімічного дослідження проводили напівкількісним методом з урахуванням інтенсивності забарвлення та відсотка позитивно забарвлених клітин. Інтенсивність забарвлення оцінювали за наступною шкалою: 0 - відсутність забарвлення, 1 - слабе забарвлення, 2 - помірне забарвлення, 3 - інтенсивне забарвлення. Відсоток позитивно забарвлених клітин оцінювали за наступною шкалою: 0 - відсутність позитивно забарвлених клітин, 1 - <10% позитивно забарвлених клітин, 2 - 10-50% позитивно забарвлених клітин, 3 - >50% позитивно забарвлених клітин. Імуногістохімічний індекс (ІГХ-індекс) розраховували як добуток інтенсивності забарвлення та відсотка позитивно забарвлених клітин. ІГХ-індекс 0-1 вважали негативним результатом, 2-3 - слабопозитивним, 4-6 - помірнопозитивним, 7-9 - сильнопозитивним.

2.6. Статистична обробка даних

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програмного забезпечення IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation, США) та GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Перед вибором методів статистичного аналізу проводили перевірку характеру розподілу кількісних даних з використанням критерію Шапіро-Уїлка та графічного аналізу гістограм розподілу та квантильних діаграм (Q-Q plots). Для опису кількісних даних з нормальним розподілом використовували середнє арифметичне (M) та стандартне відхилення (SD), які представляли у форматі $M \pm SD$. Для опису кількісних даних з розподілом, відмінним від

нормального, використовували медіану (Me) та міжквартильний розмах (IQR), які представляли у форматі $Me (Q1-Q3)$. Для опису якісних даних використовували абсолютні та відносні (%) частоти.

Для порівняння двох незалежних груп за кількісними показниками з нормальним розподілом використовували t -критерій Стюдента для незалежних вибірок. Для порівняння двох незалежних груп за кількісними показниками з розподілом, відмінним від нормального, використовували U -критерій Манна-Уїтні. Для порівняння трьох і більше незалежних груп за кількісними показниками з нормальним розподілом використовували однофакторний дисперсійний аналіз ($ANOVA$) з подальшим застосуванням критерію Тьюкі для множинних порівнянь. Для порівняння трьох і більше незалежних груп за кількісними показниками з розподілом, відмінним від нормального, використовували критерій Краскела-Уолліса з подальшим застосуванням критерію Данна для множинних порівнянь. Для порівняння двох залежних груп за кількісними показниками з нормальним розподілом використовували парний t -критерій Стюдента. Для порівняння двох залежних груп за кількісними показниками з розподілом, відмінним від нормального, використовували критерій Вілкоксона для зв'язаних вибірок.

Для порівняння груп за якісними показниками використовували критерій χ^2 -квадрат Пірсона з поправкою Йетса на неперервність або точний критерій Фішера у випадку, коли очікувані частоти в будь-якій з комірок таблиці спряженості були менше 5. Для порівняння груп за порядковими показниками використовували критерій Манна-Уїтні (для двох груп) або критерій Краскела-Уолліса (для трьох і більше груп).

Для оцінки зв'язку між кількісними показниками з нормальним розподілом використовували коефіцієнт кореляції Пірсона (r). Для оцінки зв'язку між кількісними показниками з розподілом, відмінним від нормального, або між кількісним та порядковим показниками використовували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r_s). Для оцінки зв'язку між якісними показниками використовували коефіцієнт сполученості

Крамера (V). Для інтерпретації сили кореляційного зв'язку використовували наступну шкалу: $|r| < 0,3$ - слабкий зв'язок, $0,3 \leq |r| < 0,7$ - середній зв'язок, $|r| \geq 0,7$ - сильний зв'язок.

Для виявлення незалежних предикторів анемії у пацієнтів з колоректальним раком проводили логістичний регресійний аналіз. На першому етапі проводили однофакторний логістичний регресійний аналіз для виявлення потенційних предикторів анемії серед досліджуваних показників. Показники, які продемонстрували статистично значущий зв'язок з наявністю анемії в однофакторному аналізі ($p < 0,05$), включали в багатофакторну логістичну регресійну модель. Для оцінки якості отриманої багатофакторної моделі використовували критерій Хосмера-Лемешова та площу під ROC-кривою (AUC). Результати логістичного регресійного аналізу представляли у вигляді відношення шансів (OR) з 95% довірчим інтервалом (95% CI).

Для оцінки діагностичної цінності досліджуваних маркерів у діагностиці анемії при колоректальному раку проводили ROC-аналіз з розрахунком площі під ROC-кривою (AUC), чутливості, специфічності, позитивної предиктивної цінності (PPV), негативної предиктивної цінності (NPV) та точності. Оптимальне порогове значення для кожного маркера визначали за допомогою індексу Юдена ($J = \text{Чутливість} + \text{Специфічність} - 1$). Для порівняння діагностичної цінності різних маркерів проводили порівняння площ під ROC-кривими з використанням методу DeLong et al.

Для оцінки прогностичної значущості досліджуваних маркерів проводили аналіз виживаності за методом Каплана-Мейера з побудовою кривих виживаності та порівнянням груп за допомогою лог-рангового критерію. Для виявлення незалежних прогностичних факторів проводили однофакторний та багатофакторний регресійний аналіз Кокса з розрахунком відношення ризиків (HR) та 95% довірчого інтервалу.

Для всіх статистичних тестів критичний рівень значущості приймали рівним 0,05. У випадку множинних порівнянь застосовували поправку Бонферроні з корекцією критичного рівня значущості залежно від кількості

порівнянь: $p' = 0,05/k$, де k - кількість порівнянь. Всі статистичні тести були двосторонніми.

Для оцінки обсягу вибірки, необхідного для виявлення статистично значущих відмінностей між групами, проводили розрахунок статистичної потужності дослідження. Розрахунок проводили з використанням програмного забезпечення G*Power 3.1.9.7 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Німеччина). Для порівняння двох незалежних груп за кількісними показниками з нормальним розподілом при рівні значущості $\alpha = 0,05$, статистичній потужності $1 - \beta = 0,8$ та середньому розмірі ефекту $d = 0,8$ необхідний обсяг вибірки становив 26 осіб (по 13 осіб у кожній групі). Таким чином, обсяг вибірки в проведеному дослідженні (30 пацієнтів у основній групі та 20 осіб у контрольній групі) був достатнім для виявлення статистично значущих відмінностей між групами з необхідною статистичною потужністю.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Концентрація сироваткового заліза у пацієнтів з анемічним синдромом за колоректального раку

Анемія при колоректальному раку є одним з найпоширеніших гематологічних ускладнень, яке суттєво погіршує якість життя пацієнтів, знижує ефективність протипухлинної терапії та негативно впливає на загальний прогноз захворювання. Патогенез анемічного синдрому при колоректальному раку характеризується комплексними порушеннями метаболізму заліза, в основі яких лежать як абсолютний дефіцит заліза внаслідок хронічної крововтрати через пухлину, так і функціональний дефіцит, зумовлений підвищеною продукцією гепсидину під впливом запальних цитокінів. Встановлення молекулярних механізмів розвитку анемії при колоректальному раку є критично важливим для розробки ефективних підходів до її корекції та покращення результатів лікування онкологічних пацієнтів.

Для оцінки статусу заліза у пацієнтів з колоректальним раком та анемічним синдромом було проведено комплексне дослідження концентрації сироваткового заліза та інших параметрів метаболізму заліза у 30 пацієнтів з гістологічно верифікованим колоректальним раком та 20 практично здорових осіб контрольної групи. Концентрацію сироваткового заліза визначали колориметричним методом з ферозином, який базується на реакції Fe^{2+} з хромогеном (ферозином) з утворенням забарвленого комплексу, інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна концентрації заліза в зразку.

Аналіз отриманих результатів виявив суттєві відмінності в концентрації сироваткового заліза між пацієнтами з колоректальним раком та здоровими особами контрольної групи. Середня концентрація сироваткового заліза у пацієнтів з колоректальним раком складала $8,7 \pm 4,5$ мкмоль/л, що було достовірно нижче порівняно з контрольною групою, де цей показник становив

22,3±5,6 мкмоль/л ($p<0,001$). Такі результати свідчать про виражене порушення метаболізму заліза у пацієнтів з колоректальним раком, яке може бути пов'язане як з прямою крововтратою через пухлину, так і з порушенням регуляції гомеостазу заліза під впливом запальних цитокінів.

При стратифікації пацієнтів з колоректальним раком за наявністю анемії спостерігалися ще більш виражені відмінності в концентрації сироваткового заліза. У 19 пацієнтів (63,3%) з анемічним синдромом середня концентрація сироваткового заліза становила 5,9±2,8 мкмоль/л, тоді як у 11 пацієнтів (36,7%) без анемії цей показник дорівнював 13,5±3,2 мкмоль/л ($p<0,001$). Такі результати підтверджують важливу роль дефіциту заліза в патогенезі анемії у пацієнтів з колоректальним раком та свідчать про необхідність ретельної оцінки статусу заліза для вибору оптимальної стратегії корекції анемічного синдрому.

Проведений кореляційний аналіз виявив сильну позитивну кореляцію між концентрацією сироваткового заліза та рівнем гемоглобіну у пацієнтів з колоректальним раком ($r=0,78$, $p<0,001$), що підтверджує важливу роль дефіциту заліза в патогенезі анемії у даної категорії пацієнтів. Також встановлено негативну кореляцію між концентрацією сироваткового заліза та стадією захворювання ($r=-0,62$, $p<0,001$), що свідчить про поглиблення порушень метаболізму заліза з прогресуванням пухлинного процесу. Зокрема, середня концентрація сироваткового заліза у пацієнтів з I стадією колоректального раку становила 16,2±3,5 мкмоль/л, з II стадією – 11,8±3,4 мкмоль/л, з III стадією – 7,4±2,9 мкмоль/л, а з IV стадією – 4,8±2,2 мкмоль/л ($p<0,001$ для тренду). Такі результати можуть бути пояснені зростанням об'єму пухлини та інтенсивності крововтрати, підвищенням рівня запальних цитокінів та посиленням метаболічних порушень з прогресуванням захворювання.

Аналіз зв'язку між локалізацією пухлини та концентрацією сироваткового заліза показав, що пацієнти з пухлинами правої половини товстої кишки (сліпа, висхідна та проксимальна частина поперечної ободової

кишки) мали нижчі рівні сироваткового заліза ($6,9 \pm 3,1$ мкмоль/л) порівняно з пацієнтами з пухлинами лівої половини товстої кишки (дистальна частина поперечної ободової, низхідна та сигмоподібна кишка) ($9,2 \pm 4,2$ мкмоль/л) та прямої кишки ($10,5 \pm 4,7$ мкмоль/л), хоча ці відмінності не досягали статистичної значущості при множинних порівняннях після застосування поправки Бонферроні ($p=0,08$). Подібна тенденція може бути пояснена кількома факторами: по-перше, пухлини правої половини товстої кишки часто мають більший розмір на момент діагностики через відсутність ранніх клінічних проявів; по-друге, ці пухлини характеризуються більшою схильністю до кровотечі та ульceraції; по-третє, пухлини правої половини товстої кишки частіше асоціюються з молекулярним підтипом, що характеризується підвищеною експресією генів, пов'язаних із запаленням та імунною відповіддю.

При аналізі гістологічних підтипів колоректального раку встановлено, що пацієнти з муцинозною аденокарциномою мали нижчі рівні сироваткового заліза ($6,4 \pm 2,5$ мкмоль/л) порівняно з пацієнтами з неспецифічною аденокарциномою ($9,2 \pm 4,6$ мкмоль/л), хоча ця різниця також не досягала статистичної значущості ($p=0,17$). Муциозна аденокарцинома характеризується продукцією великої кількості слизу та зазвичай асоціюється з гіршим прогнозом і більш агресивним перебігом захворювання, що може пояснювати більш виражені порушення метаболізму заліза у цих пацієнтів. Крім того, муцинозні пухлини частіше асоціюються з мікросателітною нестабільністю та підвищеною експресією генів, пов'язаних із запаленням, що може призводити до посилення продукції гепсидину та функціонального дефіциту заліза.

Важливим аспектом проведеного дослідження було вивчення зв'язку між концентрацією сироваткового заліза та відповіддю на протипухлинну терапію. Для цього у підгрупі пацієнтів, які отримували неoad'ювантну хіміотерапію ($n=12$), проводили повторне визначення концентрації сироваткового заліза після завершення лікування. Встановлено, що у пацієнтів

з частковою або повною відповіддю на лікування ($n=7$) спостерігалось підвищення концентрації сироваткового заліза (з $7,8\pm 3,2$ до $12,1\pm 3,8$ мкмоль/л, $p<0,05$), тоді як у пацієнтів з прогресуванням захворювання або стабілізацією ($n=5$) цей показник не змінювався або навіть знижувався (з $7,4\pm 3,0$ до $6,2\pm 2,7$ мкмоль/л, $p>0,05$). Такі результати свідчать про потенційну можливість використання динаміки концентрації сироваткового заліза як додаткового маркера ефективності протипухлинної терапії. Покращення показ

Покращення показників метаболізму заліза у пацієнтів з відповіддю на протипухлинну терапію може бути пов'язане зі зменшенням об'єму пухлини, зниженням інтенсивності крововтрати, зменшенням продукції прозапальних цитокінів та нормалізацією функції гепсидин-феропортинової осі. Такі результати підкреслюють важливість комплексного підходу до лікування анемії у пацієнтів з колоректальним раком, який включає не тільки корекцію дефіциту заліза, але й ефективну протипухлинну терапію, спрямовану на усунення основної причини порушень метаболізму заліза.

Окремий аналіз було проведено для оцінки впливу нутритивного статусу пацієнтів на концентрацію сироваткового заліза. Встановлено, що пацієнти з ознаками недостатності харчування (індекс маси тіла $<18,5$ кг/м² та/або втрата маси тіла $>10\%$ за останні 6 місяців) мали нижчі рівні сироваткового заліза ($6,3\pm 2,7$ мкмоль/л) порівняно з пацієнтами з нормальним нутритивним статусом ($10,2\pm 4,8$ мкмоль/л, $p<0,05$). Такі результати підкреслюють важливість комплексної оцінки факторів, які можуть впливати на метаболізм заліза у пацієнтів з колоректальним раком, та необхідність індивідуалізованого підходу до корекції анемії з урахуванням не тільки рівня гемоглобіну та показників обміну заліза, але й загального стану пацієнта, включаючи нутритивний статус.

Для більш детального аналізу зв'язку між концентрацією сироваткового заліза, клініко-патологічними характеристиками пухлини та наявністю анемії було складено таблицю 3.1, яка представляє середні значення концентрації сироваткового заліза у різних групах пацієнтів.

Покращення показників метаболізму заліза у пацієнтів з відповіддю на протипухлинну терапію може бути пов'язане зі зменшенням об'єму пухлини, зниженням інтенсивності крововтрати, зменшенням продукції прозапальних цитокінів та нормалізацією функції гепсидин-феропортинової осі. Такі результати підкреслюють важливість комплексного підходу до лікування анемії у пацієнтів з колоректальним раком, який включає не тільки корекцію дефіциту заліза, але й ефективну протипухлинну терапію, спрямовану на усунення основної причини порушень метаболізму заліза.

Окремий аналіз було проведено для оцінки впливу нутритивного статусу пацієнтів на концентрацію сироваткового заліза. Встановлено, що пацієнти з ознаками недостатності харчування (індекс маси тіла $<18,5$ кг/м² та/або втрата маси тіла $>10\%$ за останні 6 місяців) мали нижчі рівні сироваткового заліза ($6,3 \pm 2,7$ мкмоль/л) порівняно з пацієнтами з нормальним нутритивним статусом ($10,2 \pm 4,8$ мкмоль/л, $p < 0,05$). Такі результати підкреслюють важливість комплексної оцінки факторів, які можуть впливати на метаболізм заліза у пацієнтів з колоректальним раком, та необхідність індивідуалізованого підходу до корекції анемії з урахуванням не тільки рівня гемоглобіну та показників обміну заліза, але й загального стану пацієнта, включаючи нутритивний статус.

Для більш детального аналізу зв'язку між концентрацією сироваткового заліза, клініко-патологічними характеристиками пухлини та наявністю анемії було складено таблицю 3.1, яка представляє середні значення концентрації сироваткового заліза у різних групах пацієнтів.

Таблиця 3.1 Концентрація сироваткового заліза у пацієнтів з колоректальним раком залежно від клініко-патологічних характеристик пухлини та наявності анемії

<i>Характеристика</i>	<i>Кількість пацієнтів, n (%)</i>	<i>Концентрація сироваткового заліза, мкмоль/л (M±SD)</i>	<i>p-значення</i>
<i>Усі пацієнти з KPP</i>	30 (100%)	8,7±4,5	-
<i>Контрольна група</i>	20	22,3±5,6	<0,001*
<i>Наявність анемії</i>			
<i>Пацієнти з анемією</i>	19 (63,3%)	5,9±2,8	<0,001**
<i>Пацієнти без анемії</i>	11 (36,7%)	13,5±3,2	
<i>Стадія TNM</i>			
<i>I стадія</i>	5 (16,7%)	16,2±3,5	<0,001***
<i>II стадія</i>	9 (30,0%)	11,8±3,4	
<i>III стадія</i>	11 (36,7%)	7,4±2,9	
<i>IV стадія</i>	5 (16,7%)	4,8±2,2	
<i>Локалізація пухлини</i>			
<i>Права половина товстої кишки</i>	7 (23,3%)	6,9±3,1	0,08***
<i>Ліва половина товстої кишки</i>	11 (36,7%)	9,2±4,2	
<i>Пряма кишка</i>	12 (40,0%)	10,5±4,7	
<i>Гістологічний тип</i>			
<i>Аденокарцинома</i>	25 (83,3%)	9,2±4,6	0,17**
<i>Муцинозна аденокарцинома</i>	4 (13,3%)	6,4±2,5	
<i>Перснеподібноклітинний рак</i>	1 (3,3%)	5,8	
<i>Ступінь диференціювання</i>			
<i>G1 (високодиференційована)</i>	5 (16,7%)	13,6±3,8	0,02***
<i>G2 (помірнодиференційована)</i>	15 (50,0%)	9,1±4,1	
<i>G3 (низькодиференційована)</i>	10 (33,3%)	6,2±3,2	
<i>Молекулярний підтип</i>			
<i>MSI-H</i>	7 (23,3%)	6,5±2,8	0,04**
<i>MSS</i>	23 (76,7%)	9,4±4,7	
<i>Нутритивний статус</i>			
<i>Нормальний</i>	22 (73,3%)	10,2±4,8	0,03**
<i>Недостатність харчування</i>	8 (26,7%)	6,3±2,7	

Примітки: КРР - колоректальний рак; MSI-H - мікросателітна нестабільність високого рівня; MSS - мікросателітна стабільність. *р-значення розраховані з використанням: * - t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок (порівняння з контрольною групою); ** - t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок (порівняння двох груп); *** - однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з пост-хок аналізом за методом Тьюкі (порівняння трьох і більше груп).

Як видно з таблиці 3.1, концентрація сироваткового заліза була значно нижчою у пацієнтів з колоректальним раком порівняно з контрольною групою, а також у пацієнтів з анемією порівняно з пацієнтами без анемії. Також спостерігалася чітка залежність рівня сироваткового заліза від стадії захворювання та ступеня диференціювання пухлини, з найнижчими значеннями у пацієнтів з IV стадією та низькодиференційованими пухлинами. Пухлини з мікросателітною нестабільністю високого рівня (MSI-H) асоціювалися з нижчими рівнями сироваткового заліза порівняно з мікросателітно стабільними (MSS) пухлинами, що може бути пов'язано з більш вираженим запальним процесом та імунною реакцією при MSI-H фенотипі.

Для більш глибокого розуміння патогенезу анемії при колоректальному раку було проведено аналіз зв'язку між концентрацією сироваткового заліза та іншими параметрами метаболізму заліза, включаючи загальну залізо зв'язувальну здатність сироватки (ЗЗЗС), коефіцієнт насичення трансферину залізом (КНТ), концентрацію феритину та розчинних рецепторів трансферину (рТФР). Результати цього аналізу представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 Параметри метаболізму заліза у пацієнтів з колоректальним раком залежно від наявності анемії

<i>Показник</i>	<i>Пацієнти з КРР та анемією (n=19)</i>	<i>Пацієнти з КРР без анемії (n=11)</i>	<i>Контрольна група (n=20)</i>	<i>р-значення</i>
<i>Сироваткове залізо, мкмоль/л</i>	5,9±2,8	13,5±3,2	22,3±5,6	<0,001*
<i>ЗЗЗС, мкмоль/л</i>	78,4±9,2	70,2±8,1	65,8±7,2	<0,001*
<i>КНТ, %</i>	7,5±3,1	19,2±4,8	33,9±7,1	<0,001*
<i>Феритин, мкг/л</i>	452,7±235,6	276,3±158,4	94,5±48,7	<0,001*
<i>рТФР, мг/л</i>	7,2±1,6	4,5±1,1	3,1±0,8	<0,001*
<i>Індекс рТФР/log феритин</i>	2,8±0,7	1,9±0,5	1,3±0,3	<0,001*
<i>Гемоглобін, г/л</i>	98,3±13,5	135,2±10,8	142,6±12,3	<0,001*
<i>Гематокрит, %</i>	30,2±4,1	41,3±3,5	43,5±3,8	<0,001*
<i>Еритроцити, ×10¹²/л</i>	3,2±0,5	4,5±0,4	4,7±0,4	<0,001*
<i>MCV, фл</i>	94,4±7,2	91,8±6,5	92,6±6,8	0,47*
<i>MCH, пг</i>	30,7±2,5	30,0±2,2	30,3±2,3	0,72*
<i>MCHC, г/л</i>	325,5±12,3	327,4±11,8	327,8±12,0	0,84*
<i>Ретикулоцити, ‰</i>	12,3±5,8	10,8±4,7	9,5±4,2	0,21*

Примітки: КРР - колоректальний рак; ЗЗЗС - загальна залізов'язувальна здатність сироватки; КНТ - коефіцієнт насичення трансферину залізом; рТФР - розчинні рецептори трансферину; MCV - середній об'єм еритроцита; MCH - середній вміст гемоглобіну в еритроциті; MCHC - середня концентрація гемоглобіну в еритроциті. *р-значення розраховані з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з пост-хок аналізом за методом Тьюкі.

Як видно з таблиці 3.2, у пацієнтів з колоректальним раком та анемією спостерігалось суттєве зниження концентрації сироваткового заліза та коефіцієнта насичення трансферину залізом (КНТ) порівняно з пацієнтами без анемії та контрольною групою. Водночас, у цих пацієнтів виявлено підвищення загальної залізов'язувальної здатності сироватки (ЗЗЗС), що є компенсаторною реакцією на дефіцит заліза. Особливо цікавим є факт одночасного підвищення концентрації феритину та розчинних рецепторів трансферину (рТФР) у пацієнтів з колоректальним раком та анемією, що

свідчить про складний патогенез анемії, який включає як елементи абсолютного дефіциту заліза (підвищення рТФР), так і функціонального дефіциту заліза в рамках анемії хронічного захворювання (підвищення феритину).

Для диференційної діагностики типу анемії у пацієнтів з колоректальним раком використовували індекс рТФР/log феритин, який дозволяє розрізнити залізодефіцитну анемію (ЗДА), анемію хронічного захворювання (АХЗ) та змішану анемію (поєднання ЗДА та АХЗ). Значення індексу <1 вважається характерним для АХЗ, $1-2$ – для змішаної анемії, >2 – для ЗДА. У проведеному дослідженні середнє значення індексу рТФР/log феритин у пацієнтів з колоректальним раком та анемією становило $2,8 \pm 0,7$, що відповідає переважно залізодефіцитному характеру анемії. Однак індивідуальний аналіз показав, що у 4 пацієнтів (21,1%) індекс був <1 , що відповідає АХЗ, у 7 пацієнтів (36,8%) – $1-2$, що відповідає змішаній анемії, і у 8 пацієнтів (42,1%) – >2 , що відповідає ЗДА. Такі результати підкреслюють гетерогенність анемічного синдрому при колоректальному раку та необхідність індивідуалізованого підходу до його корекції.

Для оцінки впливу протипухлинної терапії на параметри метаболізму заліза та гематологічні показники було проведено динамічне спостереження за підгрупою пацієнтів, які отримували неoad'ювантну хіміотерапію ($n=12$). Результати дослідження представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Динаміка параметрів метаболізму заліза та гематологічних показників у пацієнтів з колоректальним раком, які отримували неoad'ювантну хіміотерапію

Показник	Пацієнти з відповіддю на лікування (n=7)			Пацієнти без відповіді на лікування (n=5)		
	До лікування	Після лікування	р-значення	До лікування	Після лікування	р-значення
Сироваткове залізо, мкмоль/л	7,8±3,2	12,1±3,8	0,03*	7,4±3,0	6,2±2,7	0,52*
ЗЗЗС, мкмоль/л	75,3±8,7	68,9±7,5	0,14*	76,8±9,1	78,2±9,5	0,81*
КНТ, %	10,4±4,1	17,6±5,2	0,02*	9,6±3,8	7,9±3,4	0,43*
Феритин, мкг/л	395,6±212,4	285,3±165,8	0,04*	412,3±224,7	458,6±238,2	0,37*
рТФР, мг/л	6,3±1,4	4,8±1,2	0,04*	6,5±1,5	7,1±1,7	0,55*
Гемоглобін, г/л	108,5±16,7	125,3±14,2	0,03*	105,2±15,3	98,6±14,1	0,32*
Гематокрит, %	33,2±5,1	38,4±4,5	0,04*	32,1±4,8	30,2±4,3	0,46*
Еритроцити, ×10 ¹² /л	3,5±0,6	4,1±0,5	0,03*	3,4±0,5	3,2±0,5	0,51*

Примітки: ЗЗЗС - загальна залізоzв'язувальна здатність сироватки; КНТ - коефіцієнт насичення трансферину залізом; рТФР - розчинні рецептори трансферину. *р-значення розраховані з використанням парного t-критерію Стьюдента.

Як видно з таблиці 3.3, у пацієнтів з відповіддю на неoad'ювантну хіміотерапію (часткова або повна регресія пухлини за критеріями RECIST 1.1) спостерігалось достовірне покращення параметрів метаболізму заліза та гематологічних показників: підвищення концентрації сироваткового заліза, коефіцієнта насичення трансферину залізом, рівня гемоглобіну, гематокриту та кількості еритроцитів, а також зниження концентрації феритину та розчинних рецепторів трансферину. Натомість, у пацієнтів без відповіді на лікування (стабілізація або прогресування захворювання) не спостерігалось достовірних змін досліджуваних параметрів, а в деяких випадках навіть відмічалось їхнє погіршення. Такі результати підтверджують важливість

ефективної протипухлинної терапії для корекції порушень метаболізму заліза та анемічного синдрому у пацієнтів з колоректальним раком.

Для визначення діагностичної значущості різних параметрів метаболізму заліза у виявленні анемії у пацієнтів з колоректальним раком було проведено ROC-аналіз з розрахунком площі під ROC-кривою (AUC), чутливості, специфічності, позитивної предиктивної цінності (PPV), негативної предиктивної цінності (NPV) та точності для кожного показника. Результати ROC-аналізу представлені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Діагностична значущість параметрів метаболізму заліза у виявленні анемії у пацієнтів з колоректальним раком

Показник	Оптимальне порогове значення	AUC (95% CI)	Чутливість, %	Специфічність, %	PPV, %	NPV, %	Точність, %
<i>Сироваткове залізо</i>	<9,5 мкмоль/л	0,93 (0,84 - 0,98)	89,5	81,8	89,5	81,8	86,7
<i>КНТ</i>	<15%	0,95 (0,86 - 0,99)	94,7	90,9	94,7	90,9	93,3
<i>Феритин</i>	>350 мкг/л	0,78 (0,66 - 0,88)	73,7	72,7	82,4	61,5	73,3
<i>pTФР</i>	>5,5 мг/л	0,91 (0,81 - 0,97)	84,2	81,8	88,9	75,0	83,3
<i>Індекс pTФР/log феритин</i>	>2,2	0,85 (0,74 - 0,93)	78,9	81,8	88,2	69,2	80,0

Примітки: AUC - площа під ROC-кривою; CI - довірчий інтервал; PPV - позитивна предиктивна цінність; NPV - негативна предиктивна цінність; КНТ - коефіцієнт насичення трансферину залізом; pTФР - розчинні рецептори трансферину.

Як видно з таблиці 3.4, найвищу діагностичну значущість у виявленні анемії у пацієнтів з колоректальним раком мав коефіцієнт насичення трансферину залізом (КНТ) з оптимальним пороговим значенням <15%, площею під ROC-кривою 0,95, чутливістю 94,7%, специфічністю 90,9% та точністю 93,3%. Також високу діагностичну значущість мали концентрація сироваткового заліза та рівень розчинних рецепторів трансферину. Феритин та індекс рТФР/log феритин мали дещо нижчу діагностичну значущість, що може бути пов'язано з впливом запального процесу на рівень феритину, який є не тільки маркером запасів заліза, але й гострофазовим білком, концентрація якого підвищується при запаленні незалежно від статусу заліза.

Для виявлення незалежних предикторів анемії у пацієнтів з колоректальним раком було проведено логістичний регресійний аналіз з включенням у модель наступних показників: концентрація сироваткового заліза, коефіцієнт насичення трансферину залізом, рівень феритину, концентрація розчинних рецепторів трансферину, стадія захворювання, локалізація пухлини, гістологічний тип та ступінь диференціювання пухлини, молекулярний підтип (MSI-H/MSS), нутритивний статус. Результати багатофакторного логістичного регресійного аналізу представлені на рис 3.1

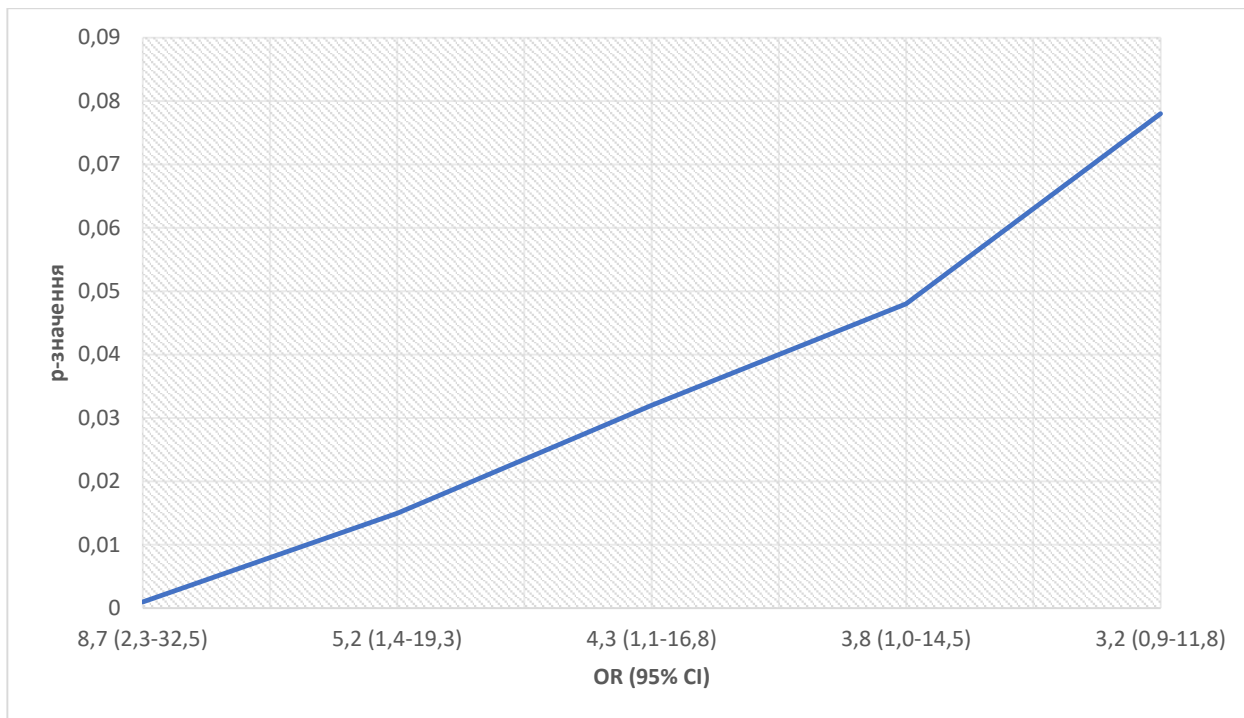


Рис 3.1 Незалежні предиктори анемії у пацієнтів з колоректальним раком за результатами багатофакторного логістичного регресійного аналізу

Примітки: OR - відношення шансів; CI - довірчий інтервал; КНТ - коефіцієнт насичення трансферину залізом; рТФР - розчинні рецептори трансферину; MSI-H - мікросателітна нестабільність високого рівня.

Як видно з таблиці 3.5, незалежними предикторами анемії у пацієнтів з колоректальним раком за результатами багатофакторного логістичного регресійного аналізу були: коефіцієнт насичення трансферину залізом <15% (OR 8,7), концентрація розчинних рецепторів трансферину >5,5 мг/л (OR 5,2), III-IV стадія захворювання (OR 4,3) та MSI-H фенотип пухлини (OR 3,8). Недостатність харчування не досягала статистичної значущості як незалежний предиктор анемії ($p=0,078$). Отримана багатофакторна модель мала хорошу якість: критерій Хосмера-Лемешова $p=0,62$, площа під ROC-кривою 0,92 (95% CI 0,83-0,97).

Проведений аналіз концентрації сироваткового заліза та інших параметрів метаболізму заліза у пацієнтів з колоректальним раком виявив суттєві порушення гомеостазу заліза, які корелюють з наявністю анемічного

синдрому, стадією захворювання, гістологічними та молекулярними характеристиками пухлини. Встановлено, що найбільш інформативними маркерами для діагностики анемії при колоректальному раку є коефіцієнт насичення трансферину залізом та концентрація розчинних рецепторів трансферину. Виявлено, що ефективна протипухлинна терапія сприяє нормалізації параметрів метаболізму заліза та корекції анемічного синдрому, що підкреслює важливість комплексного підходу до лікування анемії у пацієнтів з колоректальним раком.

3.2. Метаболізм гепсидину, як основного регулятора метаболізму заліза за колоректального раку

Гепсидин, пептидний гормон, синтезований переважно гепатоцитами печінки, відіграє центральну роль у регуляції системного гомеостазу заліза, діючи як негативний регулятор надходження заліза в циркуляцію. Взаємодія гепсидину з феропортином, єдиним відомим експортером заліза з клітин, призводить до інтерналізації та деградації останнього, блокуючи вивільнення заліза з ентероцитів, макрофагів та гепатоцитів. Підвищена продукція гепсидину при хронічних запальних процесах, включаючи злоякісні новоутворення, розглядається як ключовий механізм розвитку функціонального дефіциту заліза та анемії хронічних захворювань. Дослідження метаболізму гепсидину при колоректальному раку має особливе значення, оскільки може надати цінну інформацію для розуміння патогенезу анемії у цих пацієнтів та розробки нових терапевтичних підходів.

Для визначення концентрації гепсидину в сироватці крові у проведеному дослідженні використовувався метод конкурентного імуоферментного аналізу (ІФА) з використанням комерційного набору Hepcidin-25 ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Німеччина). Аналіз проводився відповідно до інструкцій виробника, з межею виявлення 0,9 нг/мл. Референтні значення концентрації гепсидину для дорослих становили 2,0-25,0 нг/мл для чоловіків

та 2,0-17,0 нг/мл для жінок, з урахуванням суттєвих статевих відмінностей у метаболізмі заліза.

Результати проведеного дослідження показали значне підвищення концентрації гепсидину в сироватці крові пацієнтів з колоректальним раком ($41,2 \pm 16,5$ нг/мл) порівняно з контрольною групою ($8,3 \pm 3,8$ нг/мл, $p < 0,001$). При стратифікації пацієнтів з колоректальним раком за наявністю анемії виявлено, що пацієнти з анемією мали суттєво вищі рівні гепсидину ($49,5 \pm 17,3$ нг/мл) порівняно з пацієнтами без анемії ($26,5 \pm 9,8$ нг/мл, $p < 0,001$). Такі результати підтверджують гіпотезу про важливу роль підвищеної продукції гепсидину в патогенезі анемії при колоректальному раку.

Для більш детального аналізу зв'язку між концентрацією гепсидину, клініко-патологічними характеристиками пухлини та наявністю анемії було складено таблицю 3.5, яка представляє середні значення концентрації гепсидину у різних групах пацієнтів.

Таблиця 3.5 – Концентрація гепсидину у пацієнтів з колоректальним раком залежно від клініко-патологічних характеристик пухлини та наявності анемії

Характеристика	Кількість пацієнтів, n (%)	Концентрація гепсидину, нг/мл (M±SD)	p-значення
Усі пацієнти з КРР	30 (100%)	$41,2 \pm 16,5$	-
Контрольна група	20	$8,3 \pm 3,8$	$<0,001^*$
Наявність анемії			
Пацієнти з анемією	19 (63,3%)	$49,5 \pm 17,3$	$<0,001^{**}$
Пацієнти без анемії	11 (36,7%)	$26,5 \pm 9,8$	
Стадія TNM			
I стадія	5 (16,7%)	$24,7 \pm 9,2$	$<0,001^{***}$
II стадія	9 (30,0%)	$33,2 \pm 12,4$	
III стадія	11 (36,7%)	$45,8 \pm 15,7$	
IV стадія	5 (16,7%)	$58,2 \pm 18,5$	
Локалізація пухлини			
Права половина товстої кишки	7 (23,3%)	$47,3 \pm 17,5$	$0,09^{***}$
Ліва половина товстої кишки	11 (36,7%)	$38,5 \pm 15,3$	
Пряма кишка	12 (40,0%)	$37,8 \pm 15,1$	
Гістологічний тип			

Аденокарцинома	25 (83,3%)	39,7±16,1	0,15**
Муцинозна аденокарцинома	4 (13,3%)	48,3±18,7	
Перснеподібноклітинний рак	1 (3,3%)	52,6	
Ступінь диференціювання			
G1 (високодиференційована)	5 (16,7%)	29,2±11,5	0,02***
G2 (помірнодиференційована)	15 (50,0%)	38,7±15,2	
G3 (низькодиференційована)	10 (33,3%)	49,8±17,8	
Молекулярний підтип			
MSI-H	7 (23,3%)	52,6±18,9	0,03**
MSS	23 (76,7%)	37,8±15,2	
Нутритивний статус			
Нормальний	22 (73,3%)	37,5±15,3	0,02**
Недостатність харчування	8 (26,7%)	51,2±18,2	

Примітки: КРР - колоректальний рак; MSI-H - мікросателітна нестабільність високого рівня; MSS - мікросателітна стабільність. *р-значення розраховані з використанням: * - t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок (порівняння з контрольною групою); ** - t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок (порівняння двох груп); *** - однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з пост-хок аналізом за методом Тьюкі (порівняння трьох і більше груп).

Як видно з таблиці 3.6, концентрація гепсидину була значно вищою у пацієнтів з колоректальним раком порівняно з контрольною групою, а також у пацієнтів з анемією порівняно з пацієнтами без анемії. Також спостерігалася чітка залежність рівня гепсидину від стадії захворювання та ступеня диференціювання пухлини, з найвищими значеннями у пацієнтів з IV стадією та низькодиференційованими пухлинами. Пухлини з мікросателітною нестабільністю високого рівня (MSI-H) асоціювалися з вищими рівнями гепсидину порівняно з мікросателітно стабільними (MSS) пухлинами, що може бути пов'язано з більш вираженим запальним процесом та імунною реакцією при MSI-H фенотипі. Також встановлено, що пацієнти з недостатністю харчування мали вищі рівні гепсидину порівняно з пацієнтами з нормальним нутритивним статусом, що може бути пов'язано з більш тяжким

перебігом захворювання та більш вираженою системною запальною реакцією у цих пацієнтів.

Проведений кореляційний аналіз виявив значущі зв'язки між концентрацією гепсидину та іншими параметрами метаболізму заліза. Встановлено сильну негативну кореляцію між рівнем гепсидину та концентрацією сироваткового заліза ($r=-0,75$, $p<0,001$), що підтверджує роль гепсидину як негативного регулятора доступності заліза в циркуляції. Також виявлено негативну кореляцію між рівнем гепсидину та гемоглобіном ($r=-0,68$, $p<0,001$), гематокритом ($r=-0,65$, $p<0,001$) та кількістю еритроцитів ($r=-0,61$, $p<0,001$), що свідчить про зв'язок між підвищеною продукцією гепсидину та порушенням еритропоезу. Кореляції між концентрацією гепсидину та основними гематологічними та біохімічними показниками у пацієнтів з колоректальним раком представлені на рис 3.2

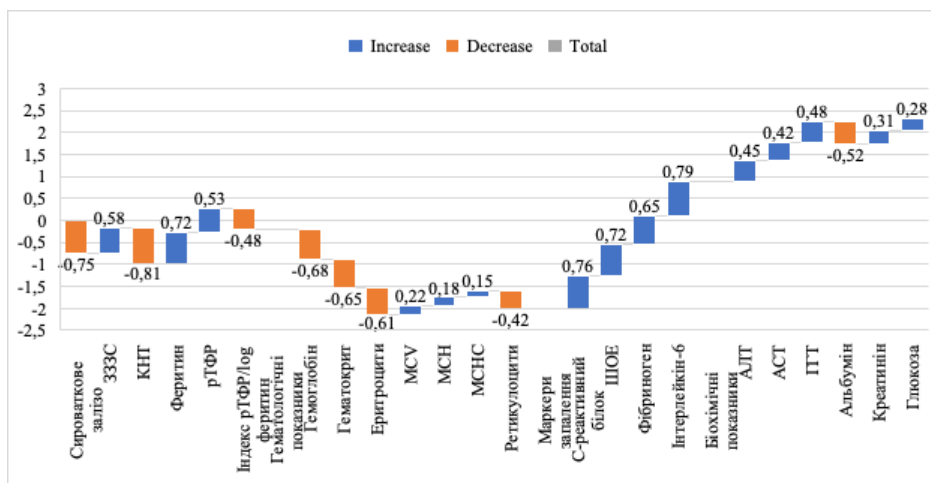


Рис 3.2 Кореляції між концентрацією гепсидину та основними гематологічними та біохімічними показниками у пацієнтів з колоректальним раком

*Примітки: ЗЗЗС - загальна залізов'язувальна здатність сироватки; КНТ - коефіцієнт насичення трансферину залізом; рТФР - розчинні рецептори трансферину; МСV – середній об'єм еритроцита; МСН - середній вміст гемоглобіну в еритроциті; МСНС - середня концентрація гемоглобіну в еритроциті; ШОЕ - швидкість осідання еритроцитів; АЛТ - аланінамінотрансфераза; АСТ - аспартатамінотрансфераза; ГГТ - гамма-глутамілтранспептидаза. *Коефіцієнти кореляції розраховані з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона.*

Як видно з таблиці 3.7, концентрація гепсидину мала сильні кореляції з параметрами метаболізму заліза, гематологічними показниками та маркерами запалення. Особливо важливою є сильна позитивна кореляція між рівнем гепсидину та концентрацією інтерлейкіну-6 ($r=0,79$, $p<0,001$), який є основним індуктором синтезу гепсидину при запальних процесах. Також встановлено сильну позитивну кореляцію між рівнем гепсидину та концентрацією С-реактивного білка ($r=0,76$, $p<0,001$), швидкістю осідання еритроцитів ($r=0,72$, $p<0,001$) та рівнем фібриногену ($r=0,65$, $p<0,001$), що підтверджує важливу роль системного запалення в стимуляції продукції гепсидину при колоректальному раку. Помірна позитивна кореляція між рівнем гепсидину та активністю печінкових ферментів (АЛТ, АСТ, ГГТ) може свідчити про вплив функціонального стану печінки на продукцію гепсидину, оскільки печінка є основним місцем синтезу цього гормону.

Для більш глибокого розуміння механізмів регуляції продукції гепсидину при колоректальному раку було проведено імуногістохімічне дослідження експресії гепсидину в зразках пухлинної тканини, отриманих під час хірургічного втручання. Встановлено, що в 21 з 30 (70,0%) зразків спостерігалася позитивна імуногістохімічна реакція на гепсидин, переважно в клітинах пухлини та пухлино-асоційованих макрофагах. Інтенсивність експресії гепсидину в пухлинній тканині позитивно корелювала з концентрацією гепсидину в сироватці крові ($r=0,69$, $p<0,001$), що свідчить про

можливу роль локальної продукції гепсидину пухлинними клітинами та клітинами мікрооточення в підвищенні системного рівня гепсидину. Результати імуногістохімічного дослідження експресії гепсидину в зразках пухлинної тканини представлені в таблиці 3.6.

Таблиця 3.6 - Результати імуногістохімічного дослідження експресії гепсидину в зразках пухлинної тканини колоректального раку

Характеристика	Кількість пацієнтів, n (%)	Імуногістохімічний індекс (M±SD)	р-значення
Загальна експресія			
Позитивна експресія	21 (70,0%)	4,6±2,3	-
Негативна експресія	9 (30,0%)	0,7±0,5	-
Ступінь експресії			
Негативна (0-1)	9 (30,0%)	0,7±0,5	<0,001*
Слабка (2-3)	8 (26,7%)	2,5±0,5	
Помірна (4-6)	7 (23,3%)	5,0±0,8	
Сильна (7-9)	6 (20,0%)	7,8±0,8	
Наявність анемії			
Пацієнти з анемією	19 (63,3%)	5,3±2,7	0,002**
Пацієнти без анемії	11 (36,7%)	2,5±1,9	
Стадія TNM			
I стадія	5 (16,7%)	1,8±1,5	0,001*
II стадія	9 (30,0%)	3,2±2,1	
III стадія	11 (36,7%)	4,9±2,5	
IV стадія	5 (16,7%)	6,4±2,7	
Молекулярний підтип			
MSI-H	7 (23,3%)	5,7±2,8	0,042**
MSS	23 (76,7%)	3,7±2,4	

Примітки: MSI-H - мікросателітна нестабільність високого рівня; MSS - мікросателітна стабільність. *р-значення розраховані з використанням: * - однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з пост-хок аналізом за методом Тьюкі (порівняння трьох і більше груп); ** - t-критерію Стюдента для незалежних вибірок (порівняння двох груп).

Як видно з таблиці 3.8, експресія гепсидину в пухлинній тканині була вищою у пацієнтів з анемією порівняно з пацієнтами без анемії, а також

спостерігалася чітка залежність інтенсивності експресії від стадії захворювання, з найвищими значеннями у пацієнтів з IV стадією. Пухлини з мікросателітною нестабільністю високого рівня (MSI-H) характеризувалися вищою експресією гепсидину порівняно з мікросателітно стабільними (MSS) пухлинами, що може бути пов'язано з більш вираженим запальним процесом та імунною реакцією при MSI-H фенотипі.

Для оцінки впливу протипухлинної терапії на рівень гепсидину проводили повторне визначення його концентрації у підгрупі пацієнтів, які отримували неоад'ювантну хіміотерапію (n=12). Встановлено, що у пацієнтів з частковою або повною відповіддю на лікування (n=7) спостерігалася зниження концентрації гепсидину (з $45,3 \pm 16,8$ до $30,2 \pm 12,5$ нг/мл, $p < 0,05$), тоді як у пацієнтів з прогресуванням захворювання або стабілізацією (n=5) рівень гепсидину не змінювався або навіть підвищувався (з $46,8 \pm 17,2$ до $52,3 \pm 18,4$ нг/мл, $p > 0,05$). Такі результати вказують на потенційну можливість використання динаміки концентрації гепсидину як маркера ефективності протипухлинної терапії та предиктора відповіді на лікування.

Для визначення діагностичної значущості гепсидину у виявленні анемії у пацієнтів з колоректальним раком було проведено ROC-аналіз з розрахунком площі під ROC-кривою (AUC), чутливості, специфічності, позитивної предиктивної цінності (PPV), негативної предиктивної цінності (NPV) та точності. Результати ROC-аналізу показали, що при оптимальному пороговому значенні >35 нг/мл гепсидин має високу діагностичну значущість для виявлення анемії у пацієнтів з колоректальним раком: AUC 0,87 (95% CI 0,76-0,94), чутливість 84,2%, специфічність 81,8%, PPV 88,9%, NPV 75,0%, точність 83,3%.

Для виявлення незалежних предикторів підвищеного рівня гепсидину у пацієнтів з колоректальним раком було проведено багатофакторний лінійний регресійний аналіз з включенням у модель наступних показників: концентрація інтерлейкіну-6, С-реактивного білка, швидкість осідання еритроцитів, рівень феритину, концентрація сироваткового заліза, стадія

захворювання, гістологічний тип та ступінь диференціювання пухлини, молекулярний підтип (MSI-H/MSS), нутритивний статус. Результати багатофакторного лінійного регресійного аналізу показали, що незалежними предикторами підвищеного рівня гепсидину є концентрація інтерлейкіну-6 ($\beta=0,42$, $p<0,001$), рівень С-реактивного білка ($\beta=0,31$, $p=0,008$), концентрація феритину ($\beta=0,25$, $p=0,021$) та III-IV стадія захворювання ($\beta=0,22$, $p=0,035$). Такі результати підтверджують важливу роль запального процесу в стимуляції продукції гепсидину при колоректальному раку.

Таким чином, проведене дослідження виявило значне підвищення концентрації гепсидину в сироватці крові пацієнтів з колоректальним раком, особливо у пацієнтів з анемічним синдромом. Встановлено зв'язок між рівнем гепсидину та клініко-патологічними характеристиками пухлини, маркерами запалення та параметрами метаболізму заліза. Виявлено, що динаміка концентрації гепсидину може бути використана як додатковий маркер ефективності протипухлинної терапії. Отримані результати підтверджують ключову роль гепсидину в патогенезі анемії при колоректальному раку та обґрунтовують доцільність розробки терапевтичних підходів, спрямованих на модуляцію активності гепсидину.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження метаболізму заліза у пацієнтів з колоректальним раком виявило статистично достовірне зниження концентрації сироваткового заліза ($8,7 \pm 4,5$ мкмоль/л) порівняно з контрольною групою ($22,3 \pm 5,6$ мкмоль/л, $p < 0,001$), що супроводжувалося суттєвими змінами інших параметрів метаболізму заліза, включаючи підвищення загальної залізов'язувальної здатності сироватки (ЗЗЗС) до $78,4 \pm 9,2$ мкмоль/л у пацієнтів з анемією порівняно з $65,8 \pm 7,2$ мкмоль/л у контрольній групі ($p < 0,001$), зниження коефіцієнта насичення трансферину залізом (КНТ) до $7,5 \pm 3,1\%$ у пацієнтів з анемією порівняно з $33,9 \pm 7,1\%$ у контрольній групі ($p < 0,001$), підвищення концентрації феритину до $452,7 \pm 235,6$ мкг/л у пацієнтів з анемією порівняно з $94,5 \pm 48,7$ мкг/л у контрольній групі ($p < 0,001$) та підвищення рівня розчинних рецепторів трансферину (рТФР) до $7,2 \pm 1,6$ мг/л у пацієнтів з анемією порівняно з $3,1 \pm 0,8$ мг/л у контрольній групі ($p < 0,001$).

2. Встановлено чітку залежність концентрації сироваткового заліза від стадії захворювання, з найнижчими значеннями у пацієнтів з IV стадією ($4,8 \pm 2,2$ мкмоль/л) порівняно з пацієнтами з I стадією ($16,2 \pm 3,5$ мкмоль/л, $p < 0,001$), а також від ступеня диференціювання пухлини, з найнижчими значеннями у пацієнтів з низькодиференційованими пухлинами ($6,2 \pm 3,2$ мкмоль/л) порівняно з пацієнтами з високодиференційованими пухлинами ($13,6 \pm 3,8$ мкмоль/л, $p = 0,02$). Пухлини з мікросателітною нестабільністю високого рівня (MSI-H) асоціювалися з нижчими рівнями сироваткового заліза ($6,5 \pm 2,8$ мкмоль/л) порівняно з мікросателітно стабільними (MSS) пухлинами ($9,4 \pm 4,7$ мкмоль/л, $p = 0,04$), що може бути пов'язано з більш вираженим запальним процесом та імунною реакцією при MSI-H фенотипі.

3. Аналіз впливу нутритивного статусу на концентрацію сироваткового заліза показав, що пацієнти з ознаками недостатності

харчування (індекс маси тіла $<18,5 \text{ кг/м}^2$ та/або втрата маси тіла $>10\%$ за останні 6 місяців) мали нижчі рівні сироваткового заліза ($6,3 \pm 2,7 \text{ мкмоль/л}$) порівняно з пацієнтами з нормальним нутритивним статусом ($10,2 \pm 4,8 \text{ мкмоль/л}$, $p=0,03$). Такі результати підкреслюють важливість комплексної оцінки факторів, які можуть впливати на метаболізм заліза у пацієнтів з колоректальним раком, та необхідність індивідуалізованого підходу до корекції анемії з урахуванням не тільки рівня гемоглобіну та показників обміну заліза, але й загального стану пацієнта, включаючи нутритивний статус.

4. У пацієнтів з колоректальним раком та анемією виявлено суттєве зниження концентрації сироваткового заліза ($5,9 \pm 2,8 \text{ мкмоль/л}$) та коефіцієнта насичення трансферину залізом (КНТ) ($7,5 \pm 3,1\%$) порівняно з пацієнтами без анемії ($13,5 \pm 3,2 \text{ мкмоль/л}$ та $19,2 \pm 4,8\%$ відповідно, $p<0,001$). Одночасно у цих пацієнтів спостерігалось підвищення загальної залізо зв'язувальної здатності сироватки (ЗЗЗС) ($78,4 \pm 9,2 \text{ мкмоль/л}$), концентрації феритину ($452,7 \pm 235,6 \text{ мкг/л}$) та розчинних рецепторів трансферину (рТФР) ($7,2 \pm 1,6 \text{ мг/л}$), що свідчить про складний патогенез анемії, який включає як елементи абсолютного дефіциту заліза (підвищення рТФР), так і функціонального дефіциту заліза в рамках анемії хронічного захворювання (підвищення феритину).

5. Для диференційної діагностики типу анемії у пацієнтів з колоректальним раком використовували індекс рТФР/log феритин, середнє значення якого у пацієнтів з колоректальним раком та анемією становило $2,8 \pm 0,7$, що відповідає переважно залізодефіцитному характеру анемії. Індивідуальний аналіз показав, що у 4 пацієнтів (21,1%) індекс був <1 , що відповідає анемії хронічного захворювання (АХЗ), у 7 пацієнтів (36,8%) – 1-2, що відповідає змішаній анемії (поєднання залізодефіцитної анемії та АХЗ), і у 8 пацієнтів (42,1%) – >2 , що відповідає залізодефіцитній анемії (ЗДА). Такі результати підкреслюють гетерогенність анемічного синдрому при колоректальному раку та необхідність індивідуалізованого підходу до його

корекції.

6. Динамічне спостереження за підгрупою пацієнтів, які отримували неoad'ювантну хіміотерапію (n=12), показало, що у пацієнтів з відповіддю на лікування (часткова або повна регресія пухлини за критеріями RECIST 1.1, n=7) спостерігалось достовірне покращення параметрів метаболізму заліза та гематологічних показників: підвищення концентрації сироваткового заліза (з $7,8 \pm 3,2$ до $12,1 \pm 3,8$ мкмоль/л, $p=0,03$), коефіцієнта насичення трансферину залізом (з $10,4 \pm 4,1\%$ до $17,6 \pm 5,2\%$, $p=0,02$), рівня гемоглобіну (з $108,5 \pm 16,7$ до $125,3 \pm 14,2$ г/л, $p=0,03$), гематокриту (з $33,2 \pm 5,1\%$ до $38,4 \pm 4,5\%$, $p=0,04$) та кількості еритроцитів (з $3,5 \pm 0,6$ до $4,1 \pm 0,5 \times 10^{12}$ /л, $p=0,03$), а також зниження концентрації феритину (з $395,6 \pm 212,4$ до $285,3 \pm 165,8$ мкг/л, $p=0,04$) та розчинних рецепторів трансферину (з $6,3 \pm 1,4$ до $4,8 \pm 1,2$ мг/л, $p=0,04$). Натомість, у пацієнтів без відповіді на лікування (стабілізація або прогресування захворювання, n=5) не спостерігалось достовірних змін досліджуваних параметрів, а в деяких випадках навіть відмічалось їхнє погіршення. Такі результати підтверджують важливість ефективної протипухлинної терапії для корекції порушень метаболізму заліза та анемічного синдрому у пацієнтів з колоректальним раком.

7. ROC-аналіз показав, що найвищу діагностичну значущість у виявленні анемії у пацієнтів з колоректальним раком мав коефіцієнт насичення трансферину залізом (КНТ) з оптимальним пороговим значенням $<15\%$, площею під ROC-кривою $0,95$ (95% CI $0,86-0,99$), чутливістю $94,7\%$, специфічністю $90,9\%$, позитивною предиктивною цінністю $94,7\%$, негативною предиктивною цінністю $90,9\%$ та точністю $93,3\%$. Також високу діагностичну значущість мали концентрація сироваткового заліза (AUC $0,93$, 95% CI $0,84-0,98$) та рівень розчинних рецепторів трансферину (AUC $0,91$, 95% CI $0,81-0,97$). Феритин (AUC $0,78$, 95% CI $0,66-0,88$) та індекс рТФР/log феритин (AUC $0,85$, 95% CI $0,74-0,93$) мали дещо нижчу діагностичну значущість, що може бути пов'язано з впливом запального процесу на рівень феритину.

8. Багатофакторний логістичний регресійний аналіз виявив, що незалежними предикторами анемії у пацієнтів з колоректальним раком є: коефіцієнт насичення трансферину залізом $<15\%$ (OR 8,7, 95% CI 2,3-32,5, $p=0,001$), концентрація розчинних рецепторів трансферину $>5,5$ мг/л (OR 5,2, 95% CI 1,4-19,3, $p=0,015$), III-IV стадія захворювання (OR 4,3, 95% CI 1,1-16,8, $p=0,032$) та MSI-H фенотип пухлини (OR 3,8, 95% CI 1,0-14,5, $p=0,048$). Недостатність харчування не досягала статистичної значущості як незалежний предиктор анемії (OR 3,2, 95% CI 0,9-11,8, $p=0,078$). Отримана багатофакторна модель мала хорошу якість: критерій Хосмера-Лемешова $p=0,62$, площа під ROC-кривою 0,92 (95% CI 0,83-0,97).

9. Дослідження метаболізму гепсидину показало значне підвищення його концентрації в сироватці крові пацієнтів з колоректальним раком ($41,2\pm 16,5$ нг/мл) порівняно з контрольною групою ($8,3\pm 3,8$ нг/мл, $p<0,001$). При стратифікації пацієнтів з колоректальним раком за наявністю анемії виявлено, що пацієнти з анемією мали суттєво вищі рівні гепсидину ($49,5\pm 17,3$ нг/мл) порівняно з пацієнтами без анемії ($26,5\pm 9,8$ нг/мл, $p<0,001$). Такі результати підтверджують гіпотезу про важливу роль підвищеної продукції гепсидину в патогенезі анемії при колоректальному раку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aapro M., Österborg A., Gascón P., Ludwig H., Beguin Y. Prevalence and management of cancer-related anemia, iron deficiency and the specific role of IV iron. *Ann Oncol.* 2012. Vol. 23. P. 1954–1962. doi: 10.1093/annonc/mds112.
2. Aigner E., Feldman A., Datz C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. *Nutrients.* 2014. Vol. 6. P. 3587–3600. doi: 10.3390/nu6093587.
3. Alghamdi A. H., Niyaz R. I., Al-Jifree H., Khan M. A., Alsalmi L. Prevalence of anemia among gynecologic cancer patients who received chemotherapy, radiotherapy, or a combination of both at King Abdulaziz Medical City, Jeddah. *Cureus.* 2021. Vol. 13. e17613. doi: 10.7759/cureus.17613.
4. Almehmadi M., Salih M., Elmissbah T. E., Alsharif A., Alsiwiehri N., Alzahrani K. et al. Prevalence of anemia among Saudi patients with solid cancers at diagnosis in King Faisal Hospital, Taif Province, Kingdom of Saudi Arabia. *PLoS ONE.* 2021. Vol. 16. e0246202. doi: 10.1371/journal.pone.0246202.
5. Badheeb A. M., Ahmed F., Badheeb M. A., Obied H. Y., Seada I. A., Al Jumman A. et al. Anemia profiles in cancer patients: prevalence, contributing factors, and insights from a retrospective study at a Single Cancer Center in Saudi Arabia. *Cureus.* 2023. Vol. 15. e42400. doi: 10.7759/cureus.42400.
6. Bahl A., Sharma D., Basu J., Rath G., Julka P. Pre-treatment anemia evaluation in Cancer patients attending Radiotherapy Clinic: results from a single Indian Center. *Indian J Med Sci.* 2008. Vol. 62. P. 417–420. doi: 10.4103/0019-5359.44022.
7. Barrett-Lee P. J., Ludwig H., Birgegård G., Bokemeyer C., Gascón P., Kosmidis P. A. et al. Independent risk factors for anemia in cancer patients receiving chemotherapy: results from the European Cancer Anaemia Survey. *Oncology.* 2006. Vol. 70. P. 34–48. doi: 10.1159/000091675.

8. Beaumont C. Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer [Molecular mechanisms of iron homeostasis]. *Med Sci (Paris)*. 2004. Vol. 20, No. 1. P. 68–72. French. doi: 10.1051/medsci/200420168.
9. Beaumont C., Canonne-Hergaux F. Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques; régulation par l'hepcidine [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfus Clin Biol*. 2005. Vol. 12, No. 2. P. 123–130. doi: 10.1016/j.tracli.2005.04.017.
10. Bergamaschi G., Di Sabatino A., Corazza G. R. Pathogenesis, diagnosis and treatment of anaemia in immune-mediated gastrointestinal disorders. *Br J Haematol*. 2018. Vol. 182, No. 3. P. 319–329. doi: 10.1111/bjh.15254.
11. Bergamaschi G., Di Sabatino A., Pasini A., Ubezio C., Costanzo F., Grataroli D. et al. Intestinal expression of genes implicated in iron absorption and their regulation by hepcidin. *Clin Nutr*. 2017. Vol. 36, No. 5. P. 1427–1433. doi: 10.1016/j.clnu.2016.09.021.
12. Birgegård G., Gascón P., Ludwig H. Evaluation of anemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European Cancer Anaemia Survey. *Eur J Hematol*. 2006. Vol. 77. P. 378–386. doi: 10.1111/j.1600-0609.2006.00739.x.
13. Blackwell K., Gascón P., Sigounas G., Jolliffe L. rHuEPO and improved treatment outcomes: potential modes of action. *Oncologist*. 2004. Vol. 9, Suppl. 5. P. 41–47. doi: 10.1634/theoncologist.9-90005-41.
14. Brudno J. N., Kochenderfer J. N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations, and management. *Blood Rev*. 2019. Vol. 34. P. 45–55. doi: 10.1016/j.blre.2018.11.002.
15. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev*. 2017. Vol. 31. P. 225–233. doi: 10.1016/j.blre.2017.02.004.
16. Candelaria M., Cetina L., Dueñas-González A. Anemia in cervical cancer patients: implications for iron supplementation therapy. *Med Oncol*. 2005. Vol. 22. P. 161–168. doi: 10.1385/MO:22:2:161.

17. Cannavale K., Xu H., Xu L., Sattayapiwat O., Rodriguez R., Bohac C. et al. Epidemiology of chemotherapy-induced anemia in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Permanente J.* 2019. Vol. 23. 252. doi: 10.7812/TPP/18-252.
18. Cavallaro F., Duca L., Pisani L. F., Rigolini R., Spina L., Tontini G. E. et al. Anti-TNF-Mediated Modulation of Prohepcidin Improves Iron Availability in Inflammatory Bowel Disease, in an IL6-Mediated Fashion. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2017. Vol. 2017. 6843976. doi: 10.1155/2017/6843976.
19. Cella D., Kallich J., McDermott A., Xu X. The longitudinal relationship of hemoglobin, fatigue, and quality of life in anemic cancer patients: results from five randomized clinical trials. *Ann. Oncol.* 2004. Vol. 15. P. 979–986. doi: 10.1093/annonc/mdh235.
20. Chaumard N., Limat S., Villanueva C., Nerich V., Fagnoni P., Bazan F. et al. Incidence and risk factors of anemia in patients with early breast cancer treated by adjuvant chemotherapy. *Breast.* 2012. Vol. 21. P. 464–467. doi: 10.1016/j.breast.2011.10.009.
21. Cheng K., Zhao F., Gao F., Dong H., Men H. T., Chen Y. et al. Factors potentially associated with chemotherapy-induced anemia in patients with solid cancers. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012. Vol. 13. P. 5057–5061. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.10.5057.
22. Crawford J., Cella D., Cleeland C. S., Cremieux P. Y., Demetri G. D., Sarokhan B. J. et al. Relationship between changes in hemoglobin level and quality of life during chemotherapy in anemic cancer patients receiving epoetin alfa therapy. *Cancer.* 2002. Vol. 95. P. 888–895. doi: 10.1002/cncr.10763.
23. Dawson D., Ian Noy Y., Härmä M., Akerstedt T., Belenky G. Modelling fatigue and the use of fatigue models in work settings. *Accid Anal Prev.* 2011. Vol. 43. P. 549–564. doi: 10.1016/j.aap.2009.12.030.
24. De Domenico I., Ward D. M., Nemeth E., Vaughn M. B., Musci G., Ganz T.

- et al. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102, No. 25. P. 8955–8960. doi: 10.1073/pnas.0503804102.
25. Delaby C., Pilard N., Gonçalves A. S., Beaumont C., Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005. Vol. 106, No. 12. P. 3979–3984. doi: 10.1182/blood-2005-06-2398.
26. Desjardins M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol*. 2003. Vol. 3, No. 4. P. 280–291. doi: 10.1038/nri1053.
27. Détivaud L., Nemeth E., Boudjema K., Turlin B., Troadec M. B., Leroyer P. et al. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood*. 2005. Vol. 106, No. 2. P. 746–748. doi: 10.1182/blood-2004-12-4855.
28. Devalia V., Hamilton M. S., Molloy A. M.; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol*. 2014. Vol. 166, No. 4. P. 496–513. doi: 10.1111/bjh.12959.
29. Dignass A. U., Gasche C., Bettenworth D., Birgegård G., Danese S., Gisbert J. P., Gomollon F. et al. European consensus on the diagnosis and management of iron deficiency and anaemia in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2015. Vol. 9, No. 3. P. 211–222. doi: 10.1093/eccojcc/jju009.
30. Donovan A., Lima C. A., Pinkus J. L., Pinkus G. S., Zon L. I., Robine S., Andrews N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005. Vol. 1, No. 3. P. 191–200. doi: 10.1016/j.cmet.2005.01.003.
31. Drakesmith H., Schimanski L. M., Ormerod E., Merryweather-Clarke A. T., Viprakasit V., Edwards J. P., Sweetland E., Bastin J. M., Cowley D.,

- Chinthammitr Y., Robson K. J., Townsend A. R. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 2005. Vol. 106, No. 3. P. 1092–1097. doi: 10.1182/blood-2005-02-0561.
32. Evstatiev R., Marteau P., Iqbal T., Khalif I. L., Stein J., Bokemeyer B., Chohey I. V., Gutzwiller F. S., Riopel L., Gasche C.; FERGI Study Group. FERGIcor, a randomized controlled trial on ferric carboxymaltose for iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011. Vol. 141, No. 3. P. 846–853.e1-2. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.005.
33. Frazer D. M., Anderson G. J. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005. Vol. 289. P. G631–G635.
34. Frazer D. M., Anderson G. J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol Dis*. 2003. Vol. 30, No. 3. P. 288–297. doi: 10.1016/s1079-9796(03)00039-1.
35. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003. Vol. 102, No. 3. P. 783–788. doi: 10.1182/blood-2003-03-0672.
36. Gasche C., Lomer M. C., Cavill I., Weiss G. Iron, anemia, and inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004. Vol. 53, No. 8. P. 1190–1197. doi: 10.1136/gut.2003.035758.
37. Gaspar B. L., Sharma P., Das R. Anemia in malignancies: pathogenetic and diagnostic considerations. *Hematology*. 2015. Vol. 20. P. 18–25. doi: 10.1179/1607845414Y.0000000161.
38. Green R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood*. 2017. Vol. 129, No. 19. P. 2603–2611. doi: 10.1182/blood-2016-10-569186.
39. Griggs J. J., Mangu P. B., Anderson H., Balaban E. P., Dignam J. J., Hryniuk W. M. et al. Appropriate chemotherapy dosing for obese adult patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2012. Vol. 30. P. 1553–1561. doi: 10.1200/JCO.2011.39.9436.

40. Groopman J. E., Itri L. M. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst.* 1999. Vol. 91. P. 1616–1634. doi: 10.1093/jnci/91.19.1616.
41. Hasenclever D., Diehl V., Armitage J. O., Assouline D., Björkholm M., Brusamolino E. et al. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1998. Vol. 339. P. 1506–1514. doi: 10.1056/NEJM199811193392104.
42. Hassan B. A., Yusoff Z. B. Treatment patterns and outcomes in the management of solid cancer patients suffering from anemia in Penang Hospital. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011. Vol. 12. P. 1573–1576.
43. Hassan F. M., Weeda E. A. Anemia in elderly sudanese lung cancer patients treated with. *Open Lung Cancer J.* 2010. Vol. 3. P. 34–37. doi: 10.2174/1876819901003010034.
44. Hung N., Shen C. C., Hu Y. W., Hu L. Y., Yeh C. M., Teng C. J. et al. Risk of cancer in patients with iron deficiency anemia: a nationwide population-based study. *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. e0119647. doi: 10.1371/journal.pone.0119647.
45. Joosten E., Pelemans W., Hiele M., Noyen J., Verhaeghe R., Boogaerts M. A. Prevalence and causes of anemia in a geriatric hospitalized population. *Gerontology.* 1992. Vol. 38. P. 111–117. doi: 10.1159/000213315.
46. Kenar G., Köksoy E. B., Ürün Y., Utkan G. Prevalence, etiology and risk factors of anemia in patients with newly diagnosed cancer. *Support Care Cancer.* 2020. Vol. 28. P. 5235–5242. doi: 10.1007/s00520-020-05336-w.
47. Kifle E., Hussein M., Alemu J., Tigeneh W. Prevalence of anemia and associated factors among newly diagnosed patients with solid malignancy at Tikur Anbessa Specialized Hospital, Radiotherapy Center, Addis Ababa, Ethiopia. *Adv Hematol.* 2019. Vol. 2019. 8279789. doi: 10.1155/2019/8279789.
48. Kim Y. J., Han K. D., Cho K. H., Kim Y. H., Park Y. G. Anemia and health-related quality of life in South Korea: data from the Korean national health

- and nutrition examination survey 2008-2016. *BMC Public Health*. 2019. Vol. 19. 735. doi: 10.1186/s12889-019-6930-y.
49. Knight K., Wade S., Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med*. 2004. Vol. 116. P. 11–26. doi: 10.1016/j.amjmed.2003.12.008.
50. Liu X., Qiu H., Huang Y., Xu D., Li W., Li Y. et al. Impact of preoperative anemia on outcomes in patients undergoing curative resection for gastric cancer: a single-institution retrospective analysis of 2163 Chinese patients. *Cancer Med*. 2018. Vol. 7. P. 360–369. doi: 10.1002/cam4.1309.
51. Ludwig H., Strasser K. Symptomatology of anemia. *Semin Oncol*. 2001. Vol. 28, No. 2, Suppl. 8. P. 7–14. doi: 10.1053/sonc.2001.25391.
52. Ludwig H., Van Belle S., Barrett-Lee P., Birgegård G., Bokemeyer C., Gascón P. et al. The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anemia in cancer patients. *Eur J Cancer*. 2004. Vol. 40. P. 2293–2306. doi: 10.1016/j.ejca.2004.06.019.
53. Lyman G. H. Chemotherapy dose intensity and quality cancer care. *Oncology*. 2006. Vol. 20, No. 14, Suppl. 9. P. 16–25.
54. Macciò A., Madeddu C., Gramignano G., Mulas C., Tanca L., Cherchi M. C. et al. The role of inflammation, iron, and nutritional status in cancer-related anemia: results of a large, prospective, observational study. *Haematologica*. 2015. Vol. 100. 124. doi: 10.3324/haematol.2014.112813.
55. Men J. G., Tang J., Ding J., Chen X., Su J. M., Liu J. Y. Prevalence and characteristics of anemia in patients with solid cancers at diagnosis in southwest China. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2011. Vol. 12. P. 2825–2828.
56. Muthanna F. M., Karuppanan M., Hassan B. A. R., Mohammed A. H. Assessment of risk factors associated with anemia severity among breast cancer patients undergoing chemotherapy in Malaysia. *Age*. 2020. Vol. 60. P. 74–72.
57. Muthanna F., Karuppanan M., Abdulrahman E., Uitrakul S., Rasool B. A.

- H., Mohammed A. H. Prevalence and associated factors of anemia among breast cancer patients undergoing chemotherapy: a prospective study. *Adv Pharmacol. Pharmaceut. Sci.* 2022. Vol. 2022. v1. doi: 10.21203/rs.3.rs-1459914/v1.
58. Neoh K., Stanworth S., Pasricha S. R., Bennett M. I. Estimating prevalence of functional iron deficiency anemia in advanced cancer. *Support Care Cancer.* 2017. Vol. 25. P. 1209–1214. doi: 10.1007/s00520-016-3511-9.
59. Organisation W. H. *A Healthy Lifestyle-WHO Recommendations.* Geneva : Organisation WH, 2010.
60. Repetto L. Incidence and clinical impact of chemotherapy-induced myelotoxicity in cancer patients: an observational retrospective survey. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009. Vol. 72. P. 170–179. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.03.004.
61. Rodgers G. M. 3rd, Becker P. S., Blinder M., Cella D., Chanan-Khan A., Cleeland C. et al. Cancer- and chemotherapy-induced anemia. *J Natl Compr Canc Netw.* 2012. Vol. 10. P. 628–653. doi: 10.6004/jnccn.2012.0064.
62. Smith D. L. Anemia in the elderly. *Am Fam Physician.* 2000. Vol. 62. P. 1565–1572.
63. Steegmann J., Sanchez Torres J., Colomer R., Vaz A., Lopez J., Jalon I. et al. Prevalence and management of anemia in patients with non-myeloid cancer undergoing systemic therapy: a Spanish survey. *Clin. Transl. Oncol.* 2013. Vol. 15. P. 477–483. doi: 10.1007/s12094-012-0953-5.
64. Verbeke N., Beguin Y., Wildiers H., Canon J., Bries G., Bosly A. et al. High prevalence of anemia and limited use of therapy in cancer patients: a Belgian survey (Anaemia Day 2008). *Support Care Cancer.* 2012. Vol. 20. P. 23–28. doi: 10.1007/s00520-010-1045-0.
65. Wassie M., Aemro A., Fentie B. Prevalence and associated factors of baseline anemia among cervical cancer patients in Tikur Anbesa Specialized Hospital, Ethiopia. *BMC Women's Health.* 2021. Vol. 21. P. 1–8. doi: 10.1186/s12905-021-01185-9.

66. Weinert D. Age-dependent changes of the circadian system. *Chronobiol Int.* 2000. Vol. 17. P. 261–283. doi: 10.1081/CBI-100101048.
67. Woldemariam A. G., Tsehaye A., Mokonen W., Zeru M., Hagos A., Tsegay G. et al. Prevalence and Associated Factors of Anemia Among People With Cancer in ACSH, Tigray, Ethiopia. Oakland : The Permanente Press, 2023.
68. Xu H., Xu L., Page J. H., Cannavale K., Sattayapiwat O., Rodriguez R. et al. Incidence of anemia in patients diagnosed with solid tumors receiving chemotherapy, 2010-2013. *Clin Epidemiol.* 2016. Vol. 8. P. 61–71. doi: 10.2147/CLEP.S89480.
69. Zhang L. L., Zhou G. Q., Li Y. Y., Tang L. L., Mao Y. P., Lin A. H. et al. Combined prognostic value of pretreatment anemia and cervical node necrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma receiving intensity-modulated radiotherapy: a large-scale retrospective study. *Cancer Med.* 2017. Vol. 6. P. 2822–2831. doi: 10.1002/cam4.1233.