

І.І. Ганусевич¹
Л.А. Мамонтова¹
А.В. Ковельська¹
Л.Д. Гуменюк¹
С.П. Меренцев²

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

²Київський міський клінічний онкологічний центр МОЗ України, Київ, Україна

Ключові слова: тромбоцити, матриксні металопротеїнази, рак шлунка, виживаність хворих.

ЖЕЛАТИНАЗИ ТРОМБОЦИТІВ, ЇХ РОЛЬ У МЕТАСТАЗУВАННІ ТА ПРОГНОЗІ ПЕРЕБІГУ РАКУ ШЛУНКА

Відомо, що білковий профіль циркулюючих тромбоцитів певною мірою відображає перебіг пухлинного процесу, тому видається доцільним пошук можливостей використання характеристик тромбоцитів і продукованих ними матриксних металопротеїназ (ММП) як маркерів пухлинного росту та для прогнозування терапевтичної відповіді пухлини чи прогресування захворювання. **Мета:** визначити зв'язки між кількістю тромбоцитів, активністю продукованих ними желатиназ (ММП-2 і -9) та клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу, дисемінацією пухлинних клітин у кістковий мозок (КМ) і виживаністю хворих на рак шлунка (РШ). **Об'єкт і методи:** досліджено зразки тромбоцитів крові 89 хворих на первинний РШ (стадії I — 13%, II — 34%, III — 35%, IV — 18%). Використано зимографію в поліакриламідному гелі, імуногістохімічний, статистичні методи. **Результати:** на пізніх стадіях РШ кількість тромбоцитів у крові зростає порівняно з початковими стадіями захворювання на 74%, сумарна активність обох желатиназ тромбоцитів на пізніх стадіях РШ, навпаки, знижується порівняно з початковими показниками на 40,5%. Активність ММП-9 тромбоцитів зворотно корелює з категорією М. Для всіх досліджених пацієнтів, а також для хворих категорії М₀ активність ММП-9 за відсутності дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) у КМ була майже в 2,0 та 1,7 рази відповідно нижча від активності за наявності ДПК. За наявності ДПК у КМ у крові пацієнтів категорії М₀ реєструють у 1,6 рази більше тромбоцитів, ніж за відсутності ДПК. Пацієнти, кількість тромбоцитів у крові яких була меншою за $2,0 \cdot 10^9/\text{мм}^3$, живуть достовірно довше та мають відносно нижчий ризик смерті від прогресування захворювання. При високій активності ММП-9 тривалість життя як всіх обстежених хворих загалом, так і пацієнтів категорії М₀ зокрема, достовірно менша, а відносний ризик вищий, ніж при низькій активності цієї желатинази. **Висновки:** кількість тромбоцитів у крові та активність їх ММП-9 є чинниками, що пов'язані зі стадією РШ, метастазуванням та осіданням ДПК у КМ, та можуть бути використані в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ з метою корекції протипухлинної терапії.

ВСТУП

Відомо, що близько 90% випадків смерті від раку пов'язані з віддаленими метастазами. Сучасні клінічні дослідження спрямовані на покращення ефективності терапії та показників виживаності хворих шляхом прогнозу перебігу онкологічного захворювання та своєчасної відповідної корекції схеми лікування. Авторами багатьох робіт вивчається можливість використання матриксних металопротеїназ (ММП) як маркерів метастазування та прогнозу захворювання. Нині рівні експресії чи активності желатиназ у пухлині та плазмі крові пов'язують із рівнем метастазування та загальною виживаністю (ЗВ) хворих на рак [1], зокрема рак шлунка (РШ) [2–5]. Деякі ММП у кістковому мозку (КМ) хворих, у тому числі МТ1-ММП, асоційовані з віддаленим метастазуванням і перитонеальною дисемінацією пухлинних клітин (ПК) при РШ [6]. При цьому ММП

вважають не лише фактором сприятливого мікрооточення ПК, але й регулятором сигнальних шляхів, через які відбувається контроль розповсюдження пухлини [7–9].

Збільшену кількість тромбоцитів у крові вперше було пов'язано із несприятливим прогнозом для хворих онкологічного профілю більше століття тому [10]. Останні дослідження показали, що тромбоцити допомагають ПК інтравазувати в кровотік і виживати в агресивному для них середовищі, захищаючи від імунної відповіді, і таким чином беруть безпосередню участь у реалізації метастатичного каскаду. Так, в експериментальних моделях при зниженні активації тромбоцитів у зв'язку з втратою рецептора GAQ, а також при порушенні тромбоутворення за відсутності фібриногену відзначали зниження темпів метастазування пухлин [11]. Також встановлено, що активація тром-

боцитів із вивільненням трансформуючого фактора росту β (ТФР- β) підсилює розвиток метастазів за рахунок епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) [12]. Проводили дослідження механізмів, що полегшують екстравазацію ПК із судинного русла до інших органів і тканин. Автори виявили потужний вплив активованих тромбоцитів на міграцію ПК через ендотеліальний моношар [12]. Тромбоцити містять щонайменше три ММП (ММП-1, -2 і -9), які через протеолітичне модулювання відповідних рецепторів регулюють процес агрегації тромбоцитів. Наприклад, виявлено, що неселективний інгібітор ММП 1,10-фенантролін інгібує агрегацію тромбоцитів [11]. Відомо, що ММП, зокрема желатинази, відіграють важливу роль у протеолітичному ремоделюванні клітинних рецепторів, задіяних у формуванні клітинних агрегатів циркулюючими ПК і тромбоцитами, і таким чином сприяють виживанню ПК у судинному руслі та підвищують ефективність їх екстравазації [13]. Тромбоцити є також джерелами регуляторів ангиогенезу при відновленні пошкоджених тканин при пухлинному рості. Показано вплив білків, продукованих тромбоцитами, на ангиогенез ксенотрансплантатів мишей [14, 15]. Встановлено, що деякі протеази (серед них ММП) активують рецептори тромбоцитів, спричиняючи вибіркоче вивільнення проангіогенних факторів [16]. Тобто є підстави вважати роль тромбоцитів в ініціації, модуляції та інгібуванні ангиогенезу важливою, але недостатньо вивченою.

Оскільки білковий профіль циркулюючих тромбоцитів певною мірою відображає характер перебігу пухлинного процесу, видається доцільним вивчення можливостей використання показників тромбоцитів і продукованих ними ММП як маркерів пухлинного росту та для прогнозування терапевтичної відповіді пухлини чи прогресування захворювання. Метою роботи було визначити можливі зв'язки між кількістю тромбоцитів, активністю продукованих ними желатиназ (ММП-2 і -9) та клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу, дисемінацією ПК у КМ і виживаністю хворих на РШ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено зразки тромбоцитів 89 хворих на первинний РШ віком від 41 до 78 років (62 чоловіки, 27 жінок), які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі Міністерства охорони здоров'я України з 2008 по 2014 р. Пацієнти не отримували передопераційної терапії. Відбір крові проводили безпосередньо перед оперативним втручанням. Хворі були проінформовані та дали згоду на використання матеріалу з дослідницькою метою.

В обстежених хворих більшість пухлин за гістологічною структурою становили аденокарциноми (57,0%), за ступенем диференціації — G_3 (40,5%), за локалізацією — пухлини нижньої третини шлунка (56,0%). Розподіл обстежених пацієнтів за II та

III стадіями захворювання був майже рівномірним (34,0 та 35,0% відповідно); групи хворих I та IV стадій становили 13 та 18% відповідно. Серед хворих переважали пацієнти з категоріями T_3 (56,0%) та M_0 (80,0%), за категоріями N_0 та N_{1-2} різниця між групами незначна (41,5 та 58,5% відповідно).

Після стандартного внутрішньовенного забору крові з неї отримували тромбоцити [17]. Кількість тромбоцитів підраховували в камері Горяєва. В отриманих зразках визначали концентрацію активних і латентних форм ММП-2 та -9 методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину як субстрату) на основі SDS-електрофорезу білків [18]. Після відмивання гелю активні форми ММП-2 та -9 візуалізувалися у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, локалізація яких визначалася за стандартами молекулярної маси («Sigma») і відповідала молекулярній масі кожного із ферментів (72 та 92 кДа відповідно). Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом вимірювання площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і -9 («Sigma»). За умовну одиницю (ум. од.) прийнято активність 1 нг ферменту в 1 г вихідного контрольного зразка. Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

Виявлення цитокератинпозитивних (panCK⁺) клітин серед мононуклеарів КМ на цитоспінових препаратах, фіксованих в ацетоні, здійснювали, використовуючи метод АРААР (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) та систему візуалізації EnVision™G/2 System/APRabbit/Mouse (PermanentRed) («DakoCytomation», Данія) з подальшим забарвленням розчином метиленового зеленого (Methyl Green histological staining reagent, ready-to-use, «DakoCytomation», Данія). Як первинні використовували мишачі МкАТ проти цитокератинів (panCK, clone AE1/AE3, «DakoCytomation», Данія). Як негативний контроль застосовували неспецифічний мишачий IgG1 (MOPC-21, «Sigma», США). Для визначення кількості panCK⁺ клітин у КМ цитоспінові препарати досліджували візуально у світловому мікроскопі при збільшенні $\times 1000$. Кількість ПК підраховували, виходячи із загальної кількості мононуклеарів на всіх отриманих цитоспінових препаратах для кожного зразка, і виражали в ум. од. на 10^6 мононуклеарних клітин. За наявності хоча б однієї ПК на 10^6 мононуклеарів КМ хворого вважався «позитивним».

Проводили статистичну обробку даних із використанням методів варіаційної статистики із застосуванням програм «Statistica 8.0» та «Prism 4.0». Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали, використовуючи t-критерій Стьюдента. Виживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра, вірогідність розбіжностей між кривими виживаності визначали за допомогою log-rank тесту. Статистичну значущість прийнято при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кількість тромбоцитів у крові обстежених хворих варіювала в межах від $1,7 \cdot 10^5/\text{мм}^3$ до $5,2 \cdot 10^5/\text{мм}^3$ крові, середнє значення становило $2,83 \pm 1,18 \cdot 10^5/\text{мм}^3$ крові. У 68% пацієнтів цей показник був у межах норми, в інших 32% — дещо знижений або підвищений, але ці зміни не досягали діагностичної значущості.

У 11% пацієнтів активності ММП-2 тромбоцитів не виявлено, у 89% показники активності ММП-2 тромбоцитів коливалися в межах від 40 до 110 ум. од./ 10^6 тромбоцитів, середнє значення становило 62 ± 27 ум. од./ 10^6 тромбоцитів. У 6% хворих не виявлено активності ММП-9 тромбоцитів, у інших ці показники варіювали від 50 до 140 ум. од./ 10^6 тромбоцитів, середнє значення — 93 ± 35 ум. од./ 10^6 тромбоцитів.

Досліджені показники не різнилися залежно від гістологічної структури, ступеня диференціації та анатомічного розташування пухлини. Результати оцінки кількості тромбоцитів у крові та активності їх желатиназ залежно від клініко-патологічних характеристик хворих на РШ наведено в табл. 1. Зазначимо, що різниця між середніми показниками активності ММП-2 при всіх варіантах порівняння була недостовірною ($p > 0,05$). Натомість середні показники кількості тромбоцитів статистично суттєво варіювали залежно від стадії захворювання ($p < 0,05$ при III стадії), а показники активності ММП-9 — від віку пацієнтів, категорій рТ, М і стадії РШ.

Таблиця 1
Клініко-патологічні характеристики хворих на РШ, кількість тромбоцитів та активність продукованих ними ММП-2 і -9

Характеристики	Кількість тромбоцитів, $\times 10^5/\text{мм}^3$	ММП-2, ум. од./ 10^6 тромбоцитів	ММП-9, ум. од./ 10^6 тромбоцитів
Стать			
чоловіча	$2,93 \pm 0,89$	46 ± 28	79 ± 29
жіноча	$2,67 \pm 0,92$	53 ± 21	98 ± 36
Вік, років			
< 63	$2,24 \pm 1,03$	49 ± 37	63 ± 18
≥ 63	$3,69 \pm 0,87$	57 ± 26	$112 \pm 27^*$
Категорія рТ			
T ₁	$2,53 \pm 0,68$	66 ± 19	98 ± 30
T ₂	$2,21 \pm 0,74$	76 ± 22	$109 \pm 27^*$
T ₃	$3,68 \pm 0,61$	57 ± 19	69 ± 21
T ₄	$3,03 \pm 0,65$	48 ± 24	60 ± 17
Категорія рN			
N ₀	$2,38 \pm 0,92$	78 ± 23	101 ± 25
N ₁₋₂	$3,63 \pm 0,66$	49 ± 21	77 ± 19
Категорія М			
M ₀	$2,79 \pm 0,85$	68 ± 20	$98 \pm 27^*$
M ₁	$3,07 \pm 0,97$	47 ± 18	52 ± 12
Стадія РШ (рTNM)			
I	$2,43 \pm 0,88$	62 ± 21	95 ± 18
II	$2,08 \pm 1,07$	88 ± 16	$112 \pm 22^*$
III	$3,82 \pm 0,63^*$	57 ± 18	74 ± 20
IV	$2,96 \pm 0,72$	41 ± 19	58 ± 14

* $p < 0,05$.

Як свідчать дані табл. 1, у чоловіків відзначають дещо більшу (на 10%) кількість тромбоцитів і нижчу (на 20%) активність ММП-9 тромбоцитів, ніж у жінок (різниця недостовірна, $p > 0,05$). Відомо, що для пацієнтів похилого віку характерні підвищені показ-

ники згортання крові, причому ММП функціонально задіяні у формуванні ембол [11, 13]. У наших дослідженнях у пацієнтів старшого віку (≥ 63 років) фіксували більшу порівняно з пацієнтами молодшого віку (< 63 років) кількість тромбоцитів у крові ($p > 0,05$) та вищу активність ММП-9 (майже у 2 рази, $p < 0,05$), що загалом узгоджується з наведеними вище даними інших дослідників.

У хворих із категоріями T₃₋₄ спостерігали загалом вищі, ніж у пацієнтів із категоріями T₁₋₂, значення кількості тромбоцитів (у 1,20–1,67 раза), але нижчу активність ММП-2 і -9 (у 1,15–1,58 та 1,50–1,82 раза відповідно); достовірною була різниця між категоріями T₂ і T₄ за показниками активності ММП-9 ($p < 0,05$). Кількість тромбоцитів у крові у хворих із регіонарними (категорія N₁₋₂) та віддаленими (категорія M₁) метастазами дещо більша, ніж у хворих без метастазів (категорії N₀ та M₀ відповідно), але різниця недостовірна ($p > 0,05$). Однак виявлено, що у пацієнтів без віддалених метастазів (M₀) активність ММП-9 тромбоцитів достовірною (у 1,9 раза, $p < 0,05$) перевищує таку у пацієнтів із наявними віддаленими метастазами (див. табл. 1).

Аналогічні відмінності характерні також для стадій за рTNM при достовірній різниці між показниками кількості тромбоцитів для хворих II та III стадій і активності ММП-9 для хворих II та IV стадій пухлинного процесу ($p < 0,05$). Показано, що загалом при РШ I–II стадії кількість тромбоцитів у крові становила $2,12 \pm 0,89 \cdot 10^5/\text{мм}^3$, а III–IV стадії — $3,68 \pm 0,63 \cdot 10^5/\text{мм}^3$, тобто на пізніх стадіях кількість тромбоцитів у крові зростає порівняно з початковими стадіями захворювання на 74% (рис. 1), що узгоджується з відомими даними про збільшення кількості тромбоцитів у крові в процесі розвитку пухлини [10]. При цьому сумарна активність досліджених желатиназ тромбоцитів на пізніх стадіях РШ, навпаки, знижується порівняно з початковими стадіями на 40,5% (див. рис. 1) та становить відповідно 190 ± 37 ум. од./ 10^6 тромбоцитів і 113 ± 36 ум. од./ 10^6 тромбоцитів при I–II і III–IV стадіях захворювання.

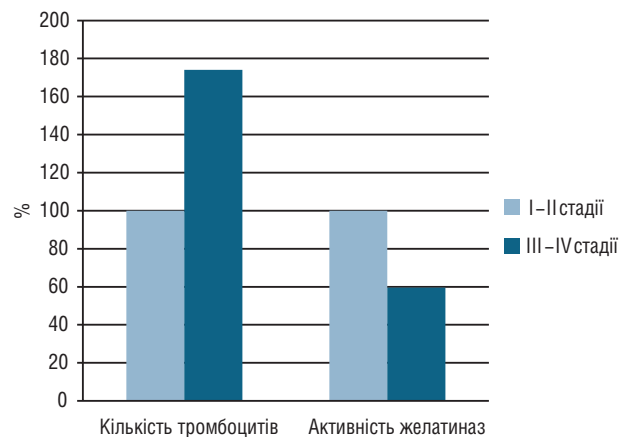


Рис. 1. Кількість тромбоцитів та активність продукованих ними желатиназ у хворих на РШ III–IV стадії (порівняно з показниками пацієнтів із РШ I–II стадії)

Виявлені зворотні зв'язки активності желатиназ зі стадіями пухлинного процесу (див. рис. 1) та наявністю віддалених метастазів (див. табл. 1) свідчать, що вищі рівні протеолітичної активності тромбоцитів характерні саме для ранніх етапів розвитку пухлини, коли віддалені метастази клінічно не проявляються, а лише відбувається їх формування та/або дисемінація ПК. Отримані результати узгоджуються з даними про залученість желатиназ тромбоцитів у метастатичний процес через протеолітичне формування клітинних рецепторів при забезпеченні виживаності циркулюючих ПК і вивільненні низки проангіогенних факторів [9, 11]. В експериментах на мишах показано, що зміни в продукції ангіогенних білків тромбоцитами проявляються ще за 30 днів до того, як модельну пухлину можна виявити пальпаторно, у подальшому концентрація цих білків продовжує зростати чи залишається значно підвищеною [19, 20]. Тісна взаємодія між тромбоцитами і мікрооточенням пухлини та здатність показників тромбоцитів відображати наявність мікроскопічної пухлини дають можливість припустити, що протеом тромбоцитів може слугувати інструментом для визначення переходу від стану спокою до експоненціального росту пухлини.

З огляду на те, що протезна активність тромбоцитів може сприяти метастазуванню на етапах циркуляції та екстравазації ПК [11–16], проаналізовано зв'язок між рівнями активності желатиназ тромбоцитів і наявністю дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) у КМ хворих на РШ (табл. 2). Для всіх досліджених пацієнтів, а також (що особливо важливо) для тих, у кого клінічно не виявлено віддалених метастазів (M_0), такий зв'язок достовірно встановлено щодо ММП-9, активність якої за відсутності ДПК у КМ була майже в 2,0 та 1,7 раза відповідно нижча за таку при наявності ДПК ($p < 0,05$). Зв'язок між рівнями активності ММП-2 тромбоцитів і наявністю ДПК у КМ виявлено на рівні тенденції. Для всіх пацієнтів і для пацієнтів із категорією M_0 активність ММП-2 за відсутності ДПК у КМ відповідно в 1,5 і 1,6 раза нижча від її активності за наявності ДПК, але ця різниця була недостовірною ($p > 0,05$). Зв'язок між кількістю тромбоцитів у крові та наявністю ДПК у КМ виявлено для хворих із категорією M_0 — за наявності ДПК у КМ у крові пацієнтів реєструють у 1,6 раза більше тромбоцитів, ніж за їх відсутності ($p < 0,05$) (див. табл. 2). Таким чином, ММП-9 тромбоцитів у крові та їх кількість є факторами, що сприяють осіданню ДПК у місцях віддаленого метастазування.

Запропоновано такий механізм участі тромбоцитів у метастазуванні [10]. Відокремлена від первинної пухлини ПК інтравазує в судинне русло, де утворює клітинні агрегати з тромбоцитами, активованими низкою інтегринів, ростових факторів, хемокінів і протеаз. Коагуляція та утворення емболу відбуваються за участю активованого тромбіну за умови активації протеазами, зокрема ММП, відповідних рецепторів ПК. ПК, що циркулює в судинному руслі

у складі клітинного агрегату, захищена від імунних впливів і має високі шанси на виживання в агресивному для неї середовищі. Наступний етап — адгезія ПК у складі агрегату до судинного ендотелію в місці віддаленого метастазування, яка відбувається також за умов протеолітичного формування відповідних рецепторів. Таким чином, не лише кількість тромбоцитів у крові пацієнта, але й рівень їх протеазної активності, зокрема активності желатиназ, може впливати на процес дисемінації ПК і таким чином визначати метастатичний потенціал пухлини, а відтак — і характер перебігу захворювання.

Таблиця 2

Кількість тромбоцитів крові та активність продукованих ними ММП-2 і -9 залежно від наявності ДПК у КМ хворих на РШ

Показник	Наявність ДПК у КМ	
	ДПК+	ДПК–
Усі хворі (n=89)		
Кількість тромбоцитів, $\times 10^5/\text{мм}^3$	$3,52 \pm 0,55$	$2,68 \pm 0,63$
ММП-2, ум. од.	84 ± 22	56 ± 20
ММП-9, ум. од.	113 ± 28	$57 \pm 23^*$
Хворі M_0 (n=71)		
Кількість тромбоцитів, $\times 10^5/\text{мм}^3$	$3,72 \pm 0,70$	$2,35 \pm 0,45^*$
ММП-2, ум. од.	78 ± 23	49 ± 18
ММП-9, ум. од.	109 ± 25	$65 \pm 16^*$

* $p < 0,05$.

З урахуванням цього проаналізовано 3В хворих на РШ залежно від кількості тромбоцитів у крові та рівня активності їх желатиназ.

Показано, що пацієнти, кількість тромбоцитів у крові яких була нижчою за $2,0 \cdot 10^5/\text{мм}^3$, живуть достовірно довше ($p = 0,0009$) та мають в 3,3 раза нижчий ($p < 0,05$) відносний ризик смерті від прогресування захворювання (hazard ratio — HR), ніж пацієнти з більшою кількістю тромбоцитів (рис. 2). Аналіз 3В залежно від активності желатиназ тромбоцитів показав, що тривалість життя хворих із високою активністю ММП-2 (> 50 ум. од.) менша порівняно з групою хворих, у яких активність ММП-2 < 50 ум. од., але ця різниця недостовірною ($p > 0,05$) (рис. 3). Тривалість життя хворих з високою активністю ММП-9 (> 60 ум. од.) достовірно менша ($p = 0,005$), а відносний ризик у 2,8 раза вищий ($p < 0,05$) порівняно з групою хворих, у яких активність ММП-9 < 60 ум. од. (рис. 4).

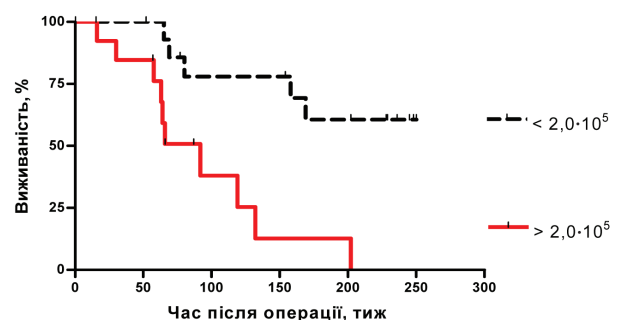


Рис. 2. 3В хворих на РШ залежно від кількості тромбоцитів у крові. Log-rank test: $p = 0,0009$, $\chi^2 = 10,95$; HR = 3,3

З огляду на проведений аналіз зв'язків між кількістю тромбоцитів, активністю їх желатиназ та ДПК у КМ хворих, зокрема категорії M_0 (див. табл. 2), ви-

далося доцільним дослідити ЗВ підгрупи пацієнтів без клінічно виявлених метастазів. Не встановлено різниці в тривалості життя та ризику смерті хворих на РШ категорії M_0 залежно від кількості тромбоцитів та активності продукованої ними ММП-2. Водночас пацієнти без клінічно виявлених метастазів, активність ММП-9 тромбоцитів у крові яких становила < 80 ум. од., жили достовірно довше ($p = 0,0234$) та мали в 2,6 рази нижчий ризик смерті ($p < 0,05$), ніж із вищою активністю цієї желатинази (рис. 5).

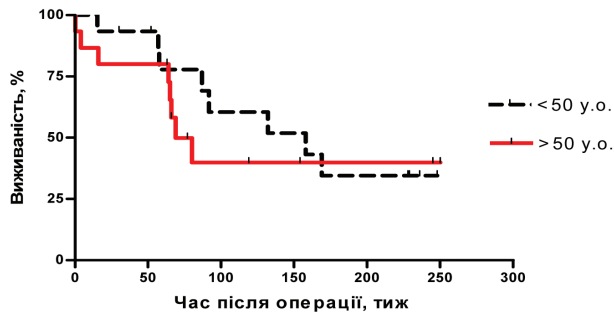


Рис. 3. ЗВ хворих на РШ залежно від активності ММП-2 тромбоцитів у крові. Log-rank test: $p = 0,083$

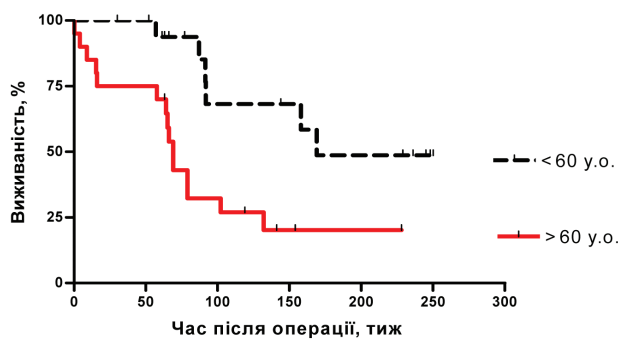


Рис. 4. ЗВ хворих на РШ залежно від активності ММП-9 тромбоцитів у крові. Log-rank test: $p = 0,0050$, $\chi^2 = 7,89$; HR = 2,8

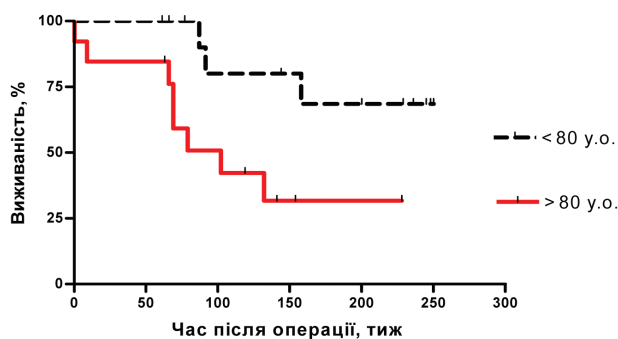


Рис. 5. ЗВ хворих на РШ категорії M_0 залежно від активності ММП-9 тромбоцитів у крові. Log-rank test: $p = 0,0234$, $\chi^2 = 5,14$; HR = 2,6

Виявлені зв'язки великої кількості тромбоцитів у крові та активності продукованої ними ММП-9 із наявністю ДПК у КМ та низькою ЗВ і високим ризиком смертності хворих на РШ узгоджуються із численними даними літератури щодо участі тромбоцитів у метастазуванні пухлини [10–12].

Під час метастазування утворення циркулюючих агрегатів тромбоцитів і ПК полегшує ухилен-

ня останніх від імунного нагляду і затримання у мікросудинах віддалених тканин. Показано, що низка молекул адгезії, таких як інтегрини і глікопротеїни, беруть участь у цьому процесі. За останніми даними, Р-селектин є ще одним важливим медіатором взаємодії тромбоцитів ПК. Інші ефекти тромбоцитів пов'язані з виділенням тромбоцитарних факторів, що стимулюють ріст пухлини та ангіогенез [21–24]. Окрім того, за даними деяких авторів, тромбоцити беруть участь у формуванні так званих передметастатичних ніш. У процесі метастазування у віддалених місцях осідання ДПК завчасно утворюються спеціалізовані мікросередовища — ніші, що сприяють як розповсюдженню ПК, так і розвитку їх у метастатичні центри. Показано, що тромбоцити через секрецію хемокінів CXCL5 і CXCR7, яка відбувається при контакті з ПК, залучають гранулоцити до ранніх передметастатичних ніш [25]. Тромбоцитарний TGF- β і прямий контакт тромбоцитів із ПК синергічно активують сигнальні шляхи TGF- β /Smad і NF- κ B у клітинах раку, що викликає їх перехід до інвазивного мезенхімального фенотипу і посилення метастазування *in vivo* [12].

Будь-яке запобігання взаємодії тромбоцитів із ПК призводило до зменшення метастазування раку, що підтверджує участь тромбоцитів у розповсюдженні пухлини та визначає їх як потенційні мішені для протипухлинної терапії [12, 22, 23, 26]. Так, у доклінічних експериментах перевірено та підтверджено принцип дії антитромбоцитарного підходу при застосуванні антиагрегатного реагенту ScFv, здатного викликати окислювальну фрагментацію активованих тромбоцитів і, як наслідок, призвести до зниження метастазування [26].

З іншого боку, залученість тромбоцитів та їх протеому в метастатичному каскаді вказує на перспективність використання їх характеристик як прогностичних маркерів. Низка сучасних досліджень демонструє можливість застосування показників кількості тромбоцитів у прогнозуванні перебігу пухлинного процесу та ефективності протипухлинної терапії при раку підшлункової залози [27, 28], легені [29, 30], прямої кишки [31], шлунка [32–36], і лише в деяких із них розглядають показники білкового профілю тромбоцитів як прогностичні маркери [24, 33, 34]. Тромбоцити є високореактивними компонентами системи кровообігу, що важливі не тільки з погляду гемостатичної активності, оскільки вони беруть участь у модуляції метастазування раку через вивільнення цитокінів, хемокінів, презентують низку молекул адгезії та продукують деякі ферменти. Використання відповідних характеристик тромбоцитів у контролі перебігу онкологічних захворювань видається доцільним та перспективним.

ВИСНОВКИ

1. На пізніх стадіях РШ кількість тромбоцитів у крові зростає порівняно з початковими стадіями захворювання на 74%, сумарна активність обох же-

латиназ тромбоцитів (ММП-2, -9) на пізніх стадіях РШ, навпаки, знижується порівняно з початковими на 40,5%. Активність ММП-9 тромбоцитів зворотно корелює з категорією М.

2. Для всіх досліджених пацієнтів, а також для тих із них, у кого клінічно не виявлено віддалених метастазів (категорія M_0), активність ММП-9 тромбоцитів за відсутності ДПК у КМ була майже в 2,0 та 1,7 раза відповідно нижчою від активності за наявності ДПК. За наявності ДПК у КМ у крові пацієнтів категорії M_0 реєструють в 1,6 раза більше тромбоцитів, ніж за їх відсутності.

3. Пацієнти, кількість тромбоцитів у крові яких була нижчою за $2,0 \cdot 10^5/\text{мм}^3$, жили достовірно довше та мали нижчий відносний ризик смерті, ніж пацієнти з вищою кількістю тромбоцитів. При високій активності ММП-9 тромбоцитів тривалість життя як усіх обстежених хворих, так і окремо пацієнтів категорії M_0 , була достовірно меншою, а відносний ризик вищим, ніж при низькій активності ММП-9.

4. Активність ММП-9 тромбоцитів і кількість останніх у крові є факторами, що пов'язані із стадіями пухлинного процесу, метастазуванням та осіданням ДПК у КМ. Показники кількості тромбоцитів у крові та активності продукованої ними ММП-9 можуть бути використані для контролю перебігу захворювання у пацієнтів із РШ з метою корекції протипухлинної терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Ганусевич ІІІ.** Роль матричних металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. Характеристика ММП, регуляция их активности, прогностическое значение. *Онкология* 2010; **12** (1): 10–6.
2. **Kubben F, Sier C, Duijn W, et al.** Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. *Br J Cancer* 2006; **94**: 1035–40.
3. **Peña S.** Matrix metalloproteinases as molecular markers in gastric cancer. *Med Clin* 2010; **134** (3): 123–6.
4. **Wu CY, Wu MS, Chiang EP, et al.** Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metalloproteinase-9 level to predict gastric cancer evolution. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 2054–60.
5. **Chu D, Zhang Z, Li Y, et al.** Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease free survival and overall survival in patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; **129**: 887–95.
6. **Mimori K, Fukagawa T, Kosaka Y, et al.** A large-scale study of MT1-MMP as a marker for isolated tumor cells in peripheral blood and bone marrow in gastric cancer cases. *An Surg Oncol* 2008; **15**(10): 2934–42.
7. **Kassenbrock K, Plaks V, Werb Z.** Matrix metalloproteinases regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; **141**: 52–67.
8. **Noel A, Gutierrez-Fernandez A, Sounni NE, et al.** New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Frontier Pharmacol* 2012; **3**: 1–9.
9. **Orlichenko LS, Radisky DC.** Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis* 2008; **25**: 593–600.
10. **Stangerand BZ, Kahn ML.** Platelets and tumor cells: a new form of border control. *Cancer Cell* 2013; **24** (8): 9–11.
11. **Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al.** Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005; **105**: 178–85.

12. **Labelle M, Begum S, Hynes RO.** Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011; **20**: 576–90.

13. **Ганусевич ІІІ.** Роль матричних металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. *Онкология* 2010; **12** (2): 108–17.

14. **Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, et al.** A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from then on angiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**: 316–25.

15. **Almog N, Ma L, Raychowdhury R, Schwager C, et al.** Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res* 2009; **69**: 836–44.

16. **Mohle R, Green D, Moore MA, et al.** Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 663–8.

17. **Qureshi AA, Karpen CW, Qureshi N, et al.** Tocotrienols-induced inhibition of platelet thrombus formation and platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 58–71.

18. **De Clerk YA, Perez N, Shimada H, et al.** Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; **52**: 701–8.

19. **Tang N, Tornatore P, Weinberger SR.** Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev* 2004; **23**: 34–44.

20. **Seibert V, Wiesner A, Buschmann T, Meuer J.** Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and Protein Chip technology in proteomics research. *Pathol Res Pract* 2004; **200**: 83–94.

21. **Borsig L.** The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; **8** (8): 1247–55.

22. **Gay LJ, Felding-Habermann B.** Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 123–34.

23. **Franco AT, Corken A, Ware J.** Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 2015; **126** (5): 582–8.

24. **Orellana R, Kato S, Erics R, et al.** Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2015; **15**: 290.

25. **Labelle M, Begum S, O. Hynes R.** Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Current Issue* 2011; **11** (30): 3053–61.

26. **Ware J.** Fragmenting the platelet to reduce metastasis. *Blood* 2012; **120** (14): 2779–80.

27. **Domínguez I, Crippa S, Thayer SP, Hung YP.** Preoperative platelet count and survival prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Surg* 2008; **32** (6): 1051–6.

28. **Schwarz RE.** Platelet counts and prognosis of pancreatic cancer. *Lancet* 1999; **353** (9170): 2158–9.

29. **Yu D, Liu B, Zhang L, Du K.** Platelet count predicts prognosis in operable non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 2013; **5** (5): 1351–4.

30. **Inagaki N, Kibata K, Tamaki T, et al.** Prognostic impact of the mean platelet volume/platelet count ratio in terms of survival in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014; **83** (1): 97–101.

31. **Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, et al.** Combination of platelet count and neutrophil to lymphocyte ratio is a useful predictor of postoperative survival in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013; **109**: 401–47.

32. **Hwang SG, Kim KM, Cheong JH, et al.** Impact of pretreatment thrombocytosis on blood-borne metastasis and prognosis of gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2012; **38**: 562–7.

33. **Wang L, Huang X, Chen Y, et al.** Prognostic value of TP/PD-ECGF and thrombocytosis in gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2012; **38**: 568–73.

34. **Hu C, Chen R, Chen W, et al.** Thrombocytosis is a significant indicator of hypercoagulability, prognosis and recurrence in gastric cancer. *Exp Ther Med* 2014; **8**: 125–32.

35. **Ishizuka M, Oyama Y, Abe A, et al.** Combination of platelet count and neutrophil to lymphocyte ratio is a useful predictor of postoperative survival in patients undergoing surgery for gastric cancer. *J Surg Oncol* 2014; **110**: 935–41.

36. **Li FX, Wei LJ, Zhang H, et al.** Significance of thrombocytosis in clinicopathologic characteristics and prognosis of gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; **15**: 6511–17.

GELATINASES OF THROMBOCYTES, THEIR ROLE IN METASTASIS AND PROGNOSIS IN GASTRIC CANCER

*I.I. Ganusevich, L.A. Mamontova, A.V. Kovelska,
L.D. Gumenyuk, S.P. Merentsev*

Summary. *It is known that the protein profile of circulatory thrombocytes represents motion of tumor process, that is why the search of possibilities of the use of characteristics of thrombocytes and produced by them matrix metalloproteinases (MMP) as markers of tumor growth and for prognostication of therapeutic answer of tumor or progress of disease seems expedient. Aim: to define correlations between the amount of thrombocytes, the activity of produced by them gelatinases (MMP-2 and -9) and by clinicopathologic characteristics of tumor process, tumor cells dissemination in bone marrow and by survivability of patients with the gastric cancer (GC). Object and methods: the specimens of blood thrombocytes of 89 patients with primary GC (stages of I – 13%, II – 34%, III – 35%, IV – 18%) were investigated. It were used zymography in a polyacrilamide gel, immunohistochemical, statistical methods. Results: on the late stages of GC the amount of blood thrombocytes grows in comparing to the initial stages of disease*

on 74%, total activity of both gelatinases of thrombocytes on the late stages of GC, opposite, goes down in comparing to initial indices 40.5%. Activity of thrombocytes MMP-9 back correlate with the category of M. For all investigated patients, and also for the patients of category of M₀, activity of MMP-9 in default of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow was almost 2.0 and 1.7 times, respectively, more subzero from such at presence of DTC. DTC in bone marrow of patients of category of M₀ were registered at 1.6 times more thrombocytes, than in default of DTC. An amount of thrombocytes in blood of patients that was below $2.0 \cdot 10^5/\text{mm}^3$, live for certain longer and have relatively a less risk of death from progress of disease. At high activity of MMP-9 life-span of both all inspected patients and patients of category of M₀, for certain is less, and relative risk higher, than at subzero activity of this gelatinases. Conclusions: amount of thrombocytes in blood and activity of them MMP-9 are factors, that is related to the stage of GC, metastasis and settling of DTC in bone marrow can be used in control of disease for patients on GC with the aim of correction of antitumoral therapy.

Key Words: thrombocytes, matrix metalloproteinases, gastric cancer, survival of patients.

Адреса для листування:

Ганусевич І.І.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: iganus2000@yahoo.com

Одержано: 23.03.2016