

С.П. Осинський¹Л.Н. Бубновська¹Д.С. Осинський²А.В. Ковельська¹Л.Д. Гуменюк¹В.М. Михайленко¹С.П. Меренцев²Е.О. Антонов³

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

²Київський міський клінічний онкологічний центр, Київ

³Миколаївський обласний онкологічний диспансер, Миколаїв, Україна

Ключові слова: рак шлунка, гіпоксія-асоційовані маркери, прогноз захворювання.

КЛІНІЧНЕ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ГІПОКСІЯ-АСОЦІЙОВАНИХ ФАКТОРІВ ПУХЛИННОГО МІКРООТОЧЕННЯ РАКУ ШЛУНКА

Мета: встановити прогностичне значення гіпоксія-асоційованих факторів, виявлених у ході наших попередніх досліджень, та надати певні рекомендації щодо їх впровадження у клінічну практику як маркерів прогнозу і контролю за перебігом захворювання. **Об'єкти і методи:** досліджено 380 хворих, які були прооперовані з приводу первинного раку шлунка, з використанням методу ³¹P ЯМР-спектроскопії, імуноферментних, імуноцитохімічних, імуногістологічних, клінічних і статистичних методів. **Результати:** проведено аналіз показників і факторів пухлинного мікрооточення, асоційованих із внутрішньопухлинною гіпоксією, та показано їх клінічне значення: у тканині первинної пухлини — рівень гіпоксії (співвідношення PME/Pi), щільність мікросудин (CD34+ клітини), кількість VEGF+, c-тус+, CXCR4+ клітин, CD8+ і CD45RO+ лімфоцити; у кістковому мозку — дисеміновані пухлинні клітини (цитокератин-позитивні), Flt-1+, CD8+, CD45RO+ клітини; у периферичній крові — концентрація VEGF, лізофосфатидилхоліну. **Висновок:** розроблено та запропоновано для клінічного застосування тест-систему для прогнозування перебігу захворювання у пацієнтів із раком шлунка.

ВСТУП

Загальновизнано, що для успішного лікування пацієнта потрібен не лише точний діагноз, але і дані щодо прогнозу як відповіді пухлини на протипухлинні засоби, так і клінічного перебігу захворювання. Ця інформація є корисною для раціонального призначення того чи іншого виду терапії та отримання максимально позитивного терапевтичного ефекту. Відомі випадки гіперлікування хворого, коли призначені засоби терапії та їх схеми спричиняли негативний ефект і не забезпечували очікуваного результату. Тому проблема інформативних і доступних маркерів, які б забезпечили контроль за ефективністю лікування та прогнозування перебігу пухлинного процесу, є вкрай актуальною.

Водночас, незважаючи на досягнення досліджень молекулярної патології пухлини, трансляція результатів вивчення біології пухлинного росту у клінічну практику з метою підвищення ефективності діагностики, прогнозу перебігу захворювання і відповіді пухлини на дію протипухлинних засобів і контролю за хворим все ще дуже повільна [1–3].

Лише незначна кількість рекомендованих до використання маркерів знайшла своє місце у клінічній практиці, зокрема при лікуванні пацієнтів із пухлинами шлунково-кишкового тракту [4] та молочної залози [5]. Помітна велика різниця між кількістю маркерів, що використовуються у практиці, і численними статтями, в яких наводяться дані щодо нових пухлинних маркерів. Загалом, після багатообіцяльних повідомлень щодо нових пухлинних мар-

керів наступні публікації часто надають суперечливі або непереконливі результати [5].

Враховуючи важливість впровадження у клінічну практику інформативних і ефективних прогностичних маркерів, розроблено рекомендації щодо досліджень з пошуку нових маркерів та їх тестування у клінічній практиці [6, 7]. Було рекомендовано систему критеріїв, за якими необхідно проводити дослідження пухлинних маркерів, оцінку їх клінічного значення та презентації у науковій літературі, яка отримала назву «REMARK» (The REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies guidelines) [6] та була опублікована одночасно у 5 онкологічних журналах. На жаль, висунуті вимоги не завжди враховуються під час оцінки значення того чи іншого пухлинного маркера та у висвітленні отриманих результатів у наукових публікаціях. Вищенаведене чітко демонструє необхідність ретельного підходу до досліджень прогностичних маркерів, аналізу їх інформативності та обробки отриманих результатів; зокрема, проведення переважно проспективних досліджень, підбору відповідних за кількісними та якісними характеристиками груп хворих, стандартизації методики визначення маркера, проведення контрольних аналізів, використання адекватних статистичних методів, у тому числі обов'язкового застосування однієї та багатофакторного аналізу прогностичної цінності маркера на основі пропорційної моделі Cox із використанням коефіцієнту ризику. Перелічені вимоги максимально враховувалися при проведенні наших досліджень.

Метою дослідження є встановлення прогностичного значення гіпоксія-асоційованих факторів, виявлених у ході наших попередніх досліджень, та розробка певних рекомендацій щодо їх клінічного впровадження як прогностичних маркерів і для контролю за перебігом захворювання.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Нами обстежено 380 хворих на первинний рак шлунка (РШ). Чоловіків було 236 (62,1%), жінок — 144 (37,9%). Середній вік хворих становив 60,4 року (від 28 до 84 років). За класифікацією TNM, I стадію захворювання зареєстровано у 82 (21,6%), II — у 67 (17,6%), III — у 103 (27,1%) та IV — у 128 (33,7%) пацієнтів. За гістологічною будовою найчастіше спостерігалася аденокарцинома — у 247 (65,0%) хворих, недиференційований рак — у 57 (15,0%), перснеподібноклітинний рак — у 47 (12,3%), слизовий рак — у 29 (7,6%) хворих. За ступенем диференціювання пухлини розподілилися таким чином: у 11 (2,9%) пацієнтів пухлини відповідали високому ступеню диференціювання, у 66 (17,3%) — середньому, у 169 (44,5%) — низькому; 134 (35,2%) — недиференційовані пухлини. Найчастіше пухлини були розташовані у нижній — 204 (53,7%) та середній третині шлунка — 117 (30,8%) випадків.

Хірургічне лікування проводили згідно з протоколом лікування хворих на РШ, затвердженим наказом МОЗ України від 17.09.2007 р. № 554 «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія». В усіх 380 хворих провели хірургічне втручання: у 117 (30,8%) виконано гастректомію, в тому числі радикальну гастректомію у 107 (91,5%) пацієнтів, паліативну — у 10 (8,5%); у 190 (50,0%) — дистальну субтотальну резекцію шлунка, в тому числі 180 (94,7%) радикальних втручань та 10 (5,3%) паліативних; у 15 (3,9%) — проксимальну резекцію шлунка; у 6 (1,6%) — клиноподібну резекцію шлунка. У 52 (13,7%) хворих виконано симптоматичні та експлоративні оперативні втручання.

Нами були досліджені такі гіпоксія-асоційовані фактори: у тканині первинної пухлини — рівень гіпоксії (визначення співвідношення РМЕ/Рі методом ^{31}P ЯМР-спектроскопії); щільність мікросудин (ЩМС; за експресією CD34), кількість VEGF+ та Flt-1+ клітин, CD8 та CD45RO Т лімфоцитів, кількість CXCR4+ та с-тус+ клітин (використовували імуногістохімічний метод); у кістковому мозку (КМ) проведено пошук дисемінованих пухлинних клітин (ДПК), CD45RO+, CD8+ Т клітин, Flt-1+ та CXCR4+ клітин (використовували імуноцитохімічний метод); у периферичній крові визначали концентрацію VEGF (застосовували імуноферментний метод) та лізофосфатидилхоліну (ЛФХ; визначали методом ^{31}P ЯМР-спектроскопії).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакетів прикладних програм NCSS 2000/PASS 2000 [7]; Prism, версія 4.03 та STATISTICA 6.0. Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали, використовуючи

t-критерій Стьюдента. Кореляційний аналіз проводили із застосуванням коефіцієнтів кореляції Пірсона (*r*) та Спірмана (*rho*). χ^2 тест був використаний для виявлення кореляції між наявністю у пухлині або КМ клітин, позитивних щодо відповідних чинників, та клініко-патологічними характеристиками хворих. Вживаність пацієнтів визначали за методом Каплана — Мейєра, розбіжності між кривими виживаності аналізували за допомогою *log-rank* тесту. Прогностичне значення показників оцінювали за допомогою пропорційної моделі Сох із використанням χ^2 тесту, коефіцієнта ризику (Hazard ratio — HR) і коефіцієнта вірогідності (Odds ratio — OR). Статистичну значущість прийнято при $p < 0,05$.

Наводимо результати наших досліджень щодо визначення клінічної ролі гіпоксія-асоційованих факторів пухлинного мікрооточення у хворих на первинний РШ. Детальні результати досліджень подані у наших попередніх публікаціях [8–20].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення рівня гіпоксії в тканині РШ встановило, що у 81,7% випадків пухлини є гіпоксичними, а оксигенованими лише у 18,3% пацієнтів. При аналізі даних щодо рівня гіпоксії у тканині РШ виділено 4 групи пухлин: РМЕ/Рі $< 1,0$ (глибока гіпоксія) — 21,0% новоутворень; $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 1,4$ (середня гіпоксія) — 27,0%; $1,4 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$ (помірна гіпоксія) — 33,7%; РМЕ/Рі $> 2,0$ (слабка гіпоксія або задовільна оксигенація) — 18,3%.

При зіставленні рівнів гіпоксії, оцінених за допомогою співвідношення РМЕ/Рі у первинних пухлинах пацієнтів із РШ з перебігом захворювання виявлено взаємозв'язок: хворі, у яких значення РМЕ/Рі $< 1,0$, тобто з глибокою гіпоксією, мали особливо несприятливий прогноз перебігу захворювання, а саме: в цій групі помер кожен другий пацієнт, тоді як у групі з показниками $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$ — 1 із 3, та 2 із 5 хворих, коли співвідношення РМЕ/Рі в пухлинній тканині $> 2,0$, тобто коли пухлини задовільно оксигеновані та знаходяться в дуже сприятливих для свого розвитку умовах. Слід зазначити, що у 88% хворих на РШ, які померли, значення РМЕ/Рі в первинній пухлині становило $< 1,4$, тобто спостерігалася глибока та середня гіпоксія.

Також встановлено важливий взаємозв'язок між високим рівнем гіпоксії у первинній пухлині та наявністю метастазів у лімфатичних вузлах хворих на РШ (табл. 1). У пацієнтів, які не мали метастазів у лімфатичних вузлах (категорія N_0), але у яких виявлено глибоку гіпоксію в первинній пухлині (РМЕ/Рі $< 1,0$), відзначено негативний перебіг захворювання, і загроза негативного результату зростає більше ніж вдвічі. За наявності метастазів (категорія N_{1-2}) та глибокої гіпоксії первинної пухлини (РМЕ/Рі $< 1,0$) відносний ризик зростає більш ніж у 4 рази.

Визначення кількості VEGF+ клітин у тканині РШ. VEGF+ клітини виявлено у 75% випадків. У середньому кількість VEGF+ клітин у пухлині

становила $46,0 \pm 3,5\%$ (розкид 0–98%, медіана — 42%). Отримано достовірну кореляцію між кількістю VEGF+ клітин та стадією пухлинного процесу: кількість VEGF+ клітин при III та IV стадії виявилася значно більшою у порівнянні з такою при I стадії ($p = 0,006$ та $p = 0,007$ відповідно). Виявлено статистично достовірну кореляцію між кількістю VEGF+ клітин у тканині РШ за наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах (категорія pN): кількість VEGF+ клітин у пухлинах хворих з категорією pN₀ була меншою в 1,6 раза ($p = 0,002$) порівняно з такою у пухлинах хворих з категорією pN₁₋₂. Отримано також статистично достовірну кореляцію між кількістю VEGF+ клітин у тканині РШ хворих із наявністю метастазів (категорія M): кількість VEGF+ клітин у пухлинах пацієнтів з категорією M₀ була меншою в 1,8 раза ($p = 0,005$) порівняно з цим показником у пухлинах хворих з категорією M₁.

Таблиця 1

Співвідношення PME/Pi у тканині РШ як прогностичний фактор у хворих з категорією N₀ (тільки операція)

Категорія N	HR	95% CI	p
N ₀ PME/Pi < 1,0	2,1	0,67–4,67	< 0,035
N ₁₋₂ PME/Pi < 1,0	4,5	0,4–2,57	< 0,027

Тут і далі: 95% CI – 95% confidence interval (довірчий інтервал).

Аналіз виживаності хворих за Капланом — Мейером відповідно до кількості VEGF+ клітин у пухлині показав, що тривалість життя пацієнтів, у пухлинах яких виявлено велику кількість таких клітин, менша за цей показник у хворих, у злоякісних утвореннях яких кількість VEGF+ клітин була незначна ($p = 0,02$). Встановлено, що у всіх хворих із кількістю VEGF+ клітин у пухлині, більшою за значення медіани (> 42%), ризик несприятливого перебігу захворювання підвищувався більше ніж у 2 рази (HR = 2,18; 95% CI 0,877–2,490; $\chi^2 = 8,02$; $p < 0,01$).

Виявлення Flt-1+ клітини у тканині РШ. Flt-1+ клітини виявлено у 75% пухлин. У середньому кількість Flt-1+ клітин у тканині РШ становила $42 \pm 3,4\%$ (розкид 0–96, медіана 42%). Аналіз виживаності хворих за методом Каплана — Мейера показав, що тривалість життя хворих, у пухлинах яких зафіксовано велику кількість Flt-1+ клітин, значно менша за таку пацієнтів, у пухлинах яких кількість Flt-1+ клітин незначна ($p = 0,05$). У хворих з кількістю Flt-1+ клітин у пухлині, більшою за значення медіани (> 42%), ризик несприятливого перебігу захворювання підвищувався більше ніж у 1,5 раза (HR = 1,62; $\chi^2 = 3,2$; $p > 0,05$), хоча цей показник виявився недостовірним.

Визначення ЩМС у тканині РШ. Виявлено, що ЩМС не є однорідною в тканині РШ і характеризується значною варіабельністю: кількість мікросудин (МС) на 1 мм² варіює від 64 до 367 (медіана становить 136 МС/мм²). Значення медіани було обрано критерієм поділу пухлин на дві групи: гіповаскуляризовані (< 136 МС/мм²) та гіперваскуляризовані (≥ 136 МС/мм²). При аналізі виживаності

хворих залежно від ступеня васкуляризації РШ встановлено, що тривалість життя хворих була більшою у пацієнтів із гіповаскуляризованими пухлинами порівняно з пацієнтами, злоякісним утворенням яких притаманна гіперваскуляризація ($p < 0,042$). Також виявлено, що значення ЩМС > 136 МС/мм² є достовірним фактором ризику несприятливого перебігу захворювання (HR = 1,6; 95% CI 0,522–2,678; $\chi^2 = 4,34$; $p < 0,05$).

Визначення експресії с-тус у тканині РШ. Встановлено, що кількість пухлин із с-тус+ ядром пухлинних клітин становить 65% (39 пухлин) і з с-тус+ цитоплазмою — 75% (51 пухлина). Середня кількість клітин із с-тус+ ядром сягала $23,9 \pm 1,7\%$ (медіана — 20, розкид 10–45%), середня кількість клітин із с-тус+ цитоплазмою — $32,7 \pm 2,5\%$ (медіана — 30, розкид 10–70%). Проведено аналіз зв'язку між виживаністю хворих та кількістю с-тус+ клітин у пухлині. Встановлено, що виживаність хворих з пухлинами, що характеризуються помірною гіпоксією та наявністю клітин із с-тус+ ядрами, була статистично суттєво гірша за таку у пацієнтів з аналогічними пухлинами, але із с-тус– ядрами ($p = 0,0426$).

Ці дані, які вказують на прямий зв'язок експресії с-тус у ядрі пухлинних клітин із несприятливим перебігом захворювання, підтверджуються тим фактом, що виживаність хворих з пухлинами, у яких кількість с-тус+ ядер була більшою за значення медіани, гірша, ніж у пацієнтів з пухлинами, в яких кількість с-тус+ ядер менша за медіану ($\chi^2 = 3,719$; $p = 0,05$).

Виявлення CD8- і CD45RO-позитивних клітин у пухлині. Загалом, у 80,0 і 85,7% пацієнтів пухлини містили CD8+ та CD45RO+ Т лімфоцити відповідно. Середня кількість CD8+ і CD45RO+ клітин у пухлині становила $37,3 \pm 2,5$ і $40,8 \pm 2,7\%$ відповідно. Медіана кількості CD8+ і CD45RO+ клітин була 34,4% (розкид 5,0–78,8) і 36,4% (розкид 5,0–92,3) відповідно. Загальна виживаність була значно вищою у хворих, у яких пухлини характеризувалися великою кількістю CD8+ і CD45RO+ Т клітин, порівняно з пацієнтами, в пухлинах яких налічувалася мала кількість CD8+ і CD45RO+ клітин (log-rank тест: $p = 0,042$ і $p = 0,004$ відповідно).

Виявлення CXCR4-позитивних клітин у пухлині. У 78,5% пацієнтів пухлини містили CXCR4+ клітини. Середня кількість CXCR4+ клітин у пухлині становила $37,8 \pm 3,2\%$, медіана цього показника сягала 32,2% (розкид 11,2–87,3). Також CXCR4+ клітини виявлено у 79,3% хворих на РШ із категорією N₁₋₂ та у 87,5% пацієнтів із віддаленими метастазами. Загальна виживаність хворих була значно кращою у всіх пацієнтів з пухлинами, котрі характеризувалися CXCR4-негативним (CXCR4–) статусом, порівняно з пацієнтами із CXCR4+ пухлинами (log-rank тест: $p = 0,0375$). Більше того, продемонстровано, що загальна виживаність хворих із категорією M₀ і з CXCR4– пухлинами була суттєво вищою порівняно з пацієнтами з категорією M₀, але з CXCR4+ пухлинами (log-rank тест: $p = 0,0137$).

Виявлення ДПК у КМ. У 51 (57,3%) хворого виявлено ДПК у КМ перед операцією. Середня кількість ДПК у КМ становила $5,5 \pm 1,0/10^6$ мононуклеарів. У пацієнтів із категорією M_0 ДПК у КМ виявлено у 51,4% випадків ($6,5 \pm 2,4$ цитокератин-позитивних (СК+) клітин на 10^6 мононуклеарів), у хворих із категорією M_1 — у 78,9% випадків ($8,0 \pm 2,0$ СК-позитивних клітин на 10^6 мононуклеарів). Встановлено залежність наявності СК+ клітин у КМ від рівня гіпоксії в первинній пухлині: серед хворих з наявністю СК+ клітин у КМ у 75% випадків у первинній пухлині рівень гіпоксії реєструвався як глибокий і середній, у той час як помірний і слабкий — тільки в 32,2% ($p < 0,01$). З'ясовано, що вірогідність появи пухлинних клітин у КМ хворих із категорією M_0 зростає більше ніж в 11 разів (OR 11,4; 95% CI 2,71–47,89; $\chi^2 = 12,3$; $p < 0,001$), коли пухлини знаходяться в стані глибокої та середньої гіпоксії.

Загальна виживаність хворих з категорією M_0 і СК+ клітинами в КМ була меншою, ніж у пацієнтів із категорією M_0 без СК+ клітин у КМ ($p = 0,0497$). Так, середня тривалість життя цих хворих становила 22,5 і 39,5 міс відповідно ($p < 0,05$).

Виявлення Flt-1+ клітин у КМ. Встановлено, що Flt-1+ клітини виявляються не тільки в пухлині (як зазначено вище — у 75% пацієнтів), але і в КМ — у 58,5%. Наявність СК+ клітин у КМ супроводжується Flt-1-позитивністю в 67%, а коли пухлинні клітини в КМ не виявляються, то в КМ є Flt-1+ тільки в 45% випадків. Кореляційних зв'язків між Flt-1+ пухлинами та Flt-1+ КМ не виявлено.

Вірогідність наявності Flt-1+ клітин підвищується в КМ хворих у 2,7 раза, коли пухлини знаходяться в стані глибокої та середньої гіпоксії, хоча така вірогідність є недостовірною (OR 2,7; 95% CI 1,76–4,72; $p > 0,05$). Середня кількість Flt-1+ клітин у пухлині становить $34 \pm 3,0\%$ (медіана 47%, розкид 10–96). Загальна виживаність пацієнтів із СК+ клітинами в КМ і Flt-1+ клітинами в КМ була значно гіршою, ніж хворих без СК+ клітин у КМ, але з Flt-1+ клітинами в КМ ($p = 0,0437$).

Виявлення CXCR4+ клітин у КМ. CXCR4+ клітини у КМ були виявлені у 46% всіх хворих і у 56% пацієнтів із ДПК у КМ. Серед пацієнтів із категорією M_0 CXCR4+ клітини в КМ були виявлені у 63% хворих з наявністю ДПК у КМ.

Також показано, що CXCR4+ клітини були наявні у 46,1% випадків як в пухлині, так і в КМ, і в 20,5% випадків були відсутні і в пухлині, і у КМ. У 33,4% пацієнтів встановлено асоціацію між CXCR4-експресією в пухлині та КМ.

Продемонстровано, що CXCR4+ клітини в КМ виявляють у 73,7% випадків, коли кількість CXCR4+ клітин у пухлині більша за медіану, і в 40,0% пацієнтів, коли кількість CXCR4+ клітин у пухлині менша за медіану. Коли CXCR4+ клітини не були виявлені в пухлині, CXCR4+ клітини у КМ були знайдені тільки у 20% пацієнтів. Водночас показано, що на-

явність CXCR4+ клітин у КМ спостерігалася у 62,1% пацієнтів із CXCR4+ пухлинами.

Тривалість життя була довшою у всіх хворих, КМ яких характеризувався CXCR4-негативним статусом, порівняно з пацієнтами з CXCR4+ КМ (log-rank тест: $p = 0,044$). Більш того, продемонстровано, що тривалість життя пацієнтів із категорією M_0 з CXCR4-негативним КМ була більшою порівняно з пацієнтами з категорією M_0 , але із CXCR4+ КМ, хоча асоціація статистично не достовірною (log-rank тест: $p = 0,089$).

Отримано позитивну асоціацію між експресією CXCR4 у КМ і наявністю в КМ ДПК, особливо у хворих із категорією M_0 . Якщо пацієнти з категорією M_0 мали CXCR4+ КМ, то ризик несприятливого перебігу захворювання зростає у 3,4 раза (HR = 3,4; 95% CI 1,156–12,054; $p < 0,03$).

Виявлення CD8+ і CD45RO+ клітин у КМ. Загалом, у 80,5 і 81,3% хворих були виявлені CD8+ та CD45RO+ Т лімфоцити у КМ відповідно.

Загальна виживаність була значно кращою у пацієнтів, які характеризувалися наявністю CD8+ та CD45RO+ Т клітин у КМ, порівняно з хворими, у яких CD8+ та CD45RO+ клітини у КМ не виявлялися (log-rank тест: $p = 0,0343$, $p = 0,0235$ відповідно).

Загальна виживаність пацієнтів із категорією M_0 також була кращою у випадках, коли CD8+ і CD45RO+ Т клітини були наявні у КМ, але така залежність була статистично не достовірною (log-rank тест: $p = 0,0538$ і $p = 0,0862$ відповідно).

Отримані результати показали зв'язок між наявністю CD8+ і CD45RO+ Т клітин у КМ і загальною виживаністю пацієнтів, зокрема тривалість життя була довшою у всіх пацієнтів, у яких у КМ були виявлені CD8+ і CD45RO+ Т клітини, ніж у хворих із CD8- та CD45RO-негативним КМ.

Визначення рівня VEGF у периферичній крові. Встановлено, що рівень VEGF у сироватці крові хворих на РІШ вищий у 5 разів порівняно із вмістом VEGF у сироватці донорів. Підвищення рівня VEGF у сироватці крові пацієнтів через тривалий проміжок часу після операції (стосовно післяопераційного рівня) свідчить про рецидив захворювання та/або початок формування метастазів і може використовуватися як фактор контролю за перебігом пухлинного процесу. Рівень VEGF вище значення медіани ($> 290,0$ нг/мл) до операції може свідчити про несприятливий перебіг захворювання.

Визначення концентрації ЛФХ у сироватці крові. Проведений аналіз зв'язку між концентрацією ЛФХ у сироватці крові та деякими показниками мікрооточення первинної пухлини, асоційованих з агресивністю пухлинного процесу та його перебігом, показав, що при концентрації ЛФХ у сироватці крові < 160 ммоль/л ДПК у КМ виявляють у 67% хворих, тоді як при концентрації ЛФХ > 160 ммоль/л їх фіксують у значно меншій кількості пацієнтів. Також встановлено, що зменшена кількість CD8+ Т клітин, збільшена кількість VEGF+ та CXCR4+ клітин у пухлині міститься у хворих, у яких концен-

трація ЛФХ < 160 ммоль/л. Слід при цьому відмітити, що мала кількість CD8+ Т клітин і підвищена VEGF+ та CXCR4+ клітин є показниками агресивності пухлини та несприятливого перебігу захворювання. Отримані результати свідчать, що визначення концентрації ЛФХ у сироватці крові хворих може використовуватися у контролі за клінічним перебігом пухлинного процесу, зокрема, після проведеного лікування з метою виявлення можливості раннього метастазування.

Прогностичні характеристики вивчених гіпоксія-асоційованих факторів наведено у табл. 2.

На сьогодні існують прогностичні маркери РШ, які використовують у клінічній практиці. Відомо, що прогноз перш за все залежить від стадії захворювання, яка визначається за системою TNM. Пацієнти з I стадією пухлинного процесу мають більш сприятливий прогноз, тоді як у хворих із IV стадією прогноз незадовільний. У той же час у клінічній практиці описано випадки, які складно пояснити на підставі класичних підходів до прогнозування перебігу захворювання. Недаремно ставиться питання щодо інформативності системи TNM [21], проводяться дослідження щодо пошуку нових маркерів, які пропонуються для клінічного використання [22]. Цікавою видається пропозиція Mohri et al. [23] застосувати як маркери прогнозу не тільки показни-

ки пухлинного росту, але й дані, що характеризують стан хворого. Проведене дослідження та багатофакторний аналіз отриманих результатів дозволили авторам запропонувати для використання такі показники, як співвідношення кількості нейтрофілів до кількості лімфоцитів периферичної крові, розмір пухлини та клінічну категорію Т. Було показано, що значення співвідношення нейтрофіли/лімфоцити > 2,2, розмір пухлини > 3 см, категорія T₃ є факторами несприятливого перебігу захворювання. Слід зазначити, що певною мірою серед цих показників відносно новим виявилось співвідношення нейтрофіли/лімфоцити, яке на сьогодні досить активно вивчається як прогностичний маркер у контексті концепції взаємовідносин пухлини з організмом, зокрема взаємодії пухлинного росту і запалення [24–26].

Слід також відмітити, що автори не включили до прогностичних критеріїв статус лімфатичних вузлів, хоча категорія N, яка свідчить про наявність або відсутність пухлинних клітин у лімфатичних вузлах, тобто регіонарних метастазів, дуже важлива для оцінки процесу та вибору методів лікування [27]. Необхідно у цьому сенсі зауважити, що в аспекті проблеми прихованих пухлинних клітин можна розглядати і приховані пухлинні клітини у регіонарних лімфатичних вузлах, які можуть там існувати і не підлягати виявленню традиційними гістологічними метода-

Таблиця 2

Показники та фактори пухлинного мікрооточення, асоційовані з внутрішньопухлинною гіпоксією, та їх клінічне значення

Об'єкт дослідження, показник (маркер)	Процес, що характеризує показник	Клінічне значення показника
КМ		
ДПК (СК+ ДПК)	Наявність пухлинних клітин, приховане метастазування	Прогнозує несприятливий перебіг процесу, ризик метастазування
Fit-1 (рецептор 1 VEGF)	Наявність «передметастатичної ніші»	Асоціація з несприятливим перебігом процесу
CXCR4 (homing білок)	«Хомінг»-процес, залучення пухлинних клітин у КМ як місце, сприятливе для їх виживання	Асоціація з несприятливим перебігом процесу
CD8+ Т лімфоцити	Контроль процесу «сплячки» ДПК	Наявність CD8+ Т клітин асоціюється зі сприятливим перебігом процесу. Динаміку їх наявності можна розглядати як фактор ризику метастазування
Первинна пухлина		
Метаболічне співвідношення PME/Pi	Оцінка рівня гіпоксії	Низький рівень співвідношення (< 1,4; особливо < 1,0) вказує на несприятливий перебіг процесу, погану відповідь на терапію
VEGF+ клітини	Рівень ангиогенезу	Велика кількість клітин вказує на несприятливий перебіг процесу
ЩМС (CD34+ клітини)	Рівень неангиогенезу	Висока ЩМС вказує на несприятливий перебіг процесу
CXCR4+ клітини	«Хомінг»-білок, який експресується за умов гіпоксії і стимулює пухлинні клітини виходити з пухлини у пошуках сприятливих місць існування	Велика кількість CXCR4+ клітин вказує на несприятливий перебіг процесу
c-тус+ клітини	Білок, який пов'язаний з агресивністю пухлини	Велика кількість c-тус-+ клітин вказує на несприятливий перебіг процесу
CD8+ Т лімфоцити	Висока щільність (кількість) CD8+ Т лімфоцитів (цитотоксичних Т лімфоцитів) свідчить про реакцію імунної системи на пухлину, яка спрямована на її знешкодження	–
CD45RO+ Т лімфоцити	Висока щільність (кількість) CD45RO+ Т лімфоцитів свідчить про реакцію імунної системи на пухлину	–
Периферична кров		
Концентрація VEGF	Активність ангиогенезу	Висока концентрація VEGF вказує на несприятливий перебіг процесу
Концентрація ЛФХ	ЛФХ є попередником лізофосфатидилової кислоти, яка є одним із ключових факторів клітинної рухливості та пухлинної прогресії, зокрема завдяки індукції імуносупресивного мікрооточення пухлини	Зниження концентрації ЛФХ вказує на рецидив процесу (початок метастазування)

ми [28]. Це призводить до неправильної оцінки категорії N, яка у такому разі класифікується як N₀, тоді як у дійсності це категорія N₁. Зрозуміло, що треба досліджувати усі видалені лімфатичні вузли імуногістохімічними методами з використанням МкАТ до панцитокератинів [29, 30].

Ми провели спеціальне дослідження з метою встановити наявність чи відсутність пухлинних клітин у лімфатичних вузлах хворих на РШ із категорією N₀. У дослідженні використано зразки пухлинної тканини та регіонарних лімфатичних вузлів 120 пацієнтів із первинним РШ (у 65 осіб діагностували категорію pN₀ та у 55 — pN₁–N₂). Зразки тканини отримано відразу після видалення пухлини та лімфатичних вузлів. Імуногістохімічним методом у тканині лімфатичних вузлів виявляли панцитокератин-позитивні клітини. Як первинне антитіло використовували анти-панцитокератинові МкАТ (МNF116, DakoCytomation, Данія). Виявлення в тканині лімфатичного вузла СК+ клітин було підставою для констатації наявності пухлинних клітин, тобто метастатичного ураження. СК+ реакція в лімфатичних вузлах (pN₀) була зафіксована у 24% хворих на РШ, що збігається з результатами, отриманими іншими дослідниками. Зокрема, за даними L. E. Harrison та співавторів, СК+ реакція в лімфатичних (pN₀) була зареєстрована у 25% пацієнтів із РШ [31]. Аналіз зв'язку між наявністю «прихованих» пухлинних клітин у регіонарних лімфатичних вузлах і виживаністю хворих на РШ виявив, що виживаність хворих із СК+ лімфатичними вузлами була значно гіршою, ніж у пацієнтів із СК-негативними. Більш важливими виявилися дані про те, що після виконання однієї лише операції у хворих із СК+ лімфатичними вузлами показники виживаності були значно гіршими за такі у пацієнтів із СК+ лімфатичними вузлами, які після операції отримували стандартну хіміотерапію. Слід зазначити, що у всіх пацієнтів із СК+ лімфатичними вузлами, у яких виконано лише оперативне втручання, на підставі гістологічного дослідження лімфатичних вузлів вони були оцінені як «негативні», тобто діагностовано категорію N₀. Отримані дані підтвердили важливість статусу лімфатичних вузлів для оцінки пухлинного процесу і його прогнозу та обґрунтували необхідність впровадження імуногістохімічного дослідження лімфатичних вузлів з метою пошуку прихованих пухлинних клітин, що змінює діагноз і може впливати на вибір лікування та його ефективність [32–34].

Підсумовуючи вищезазначене, вважаємо можливим запропонувати тест-систему на основі досліджених показників, яка може бути рекомендована до клінічної перевірки з метою визначення її прогностичного значення для використання у клінічній практиці (табл. 3).

ВИСНОВКИ

1. На основі отриманих нами результатів досліджень низки гіпоксія-асоційованих факторів та факторів мікрооточення пухлини розроблено та запро-

поновано для клінічного застосування тест-систему для прогнозування перебігу захворювання у пацієнтів із РШ.

Таблиця 3

Тест-система для прогнозу клінічного перебігу РШ на основі досліджених факторів пухлинного мікрооточення та деяких пов'язаних із ними показників стану імунної системи та обміну речовин організму

Показник	Статус/динаміка	Клінічне значення
Первинна пухлина		
Рівень гіпоксії пухлини (співвідношення PME/Pi)	Співвідношення PME/Pi < 1,4 (особливо < 1,0)	Несприятливий прогноз, погана відповідь на терапію
Кількість VEGF+ клітин	> 42%	Несприятливий прогноз
ЦМС	> 136 МС/мм ²	Несприятливий прогноз
Кількість CXCR4+ клітин	> 32%	Несприятливий прогноз
Кількість с-тус+ клітин	> 20% (ядерне забарвлення)	Несприятливий прогноз
Кількість CD8+ клітин	> 34%	Сприятливий прогноз
Кількість CD45RO+ клітин	> 36%	Сприятливий прогноз
КМ		
Наявність СК+ ДПК	≥ 1 СК+ клітин на 10 ⁶ мононуклеарів КМ	Несприятливий прогноз
Наявність Flt-1+ клітин	Клітини наявні	Несприятливий прогноз
Наявність CXCR4+ клітин	Клітини наявні	Несприятливий прогноз
Наявність CD8+ клітин	Клітини наявні	Сприятливий прогноз
Периферична кров		
Концентрація VEGF	> 290 нг/мл	Несприятливий прогноз
Концентрація ЛФХ	< 0,160 ммоль/л та зменшення у динаміці спостереження	Несприятливий прогноз, ризик рецидиву пухлинного процесу

2. Запропонована тест-система потребує перевірки у клінічній практиці з урахуванням усіх вимог до прогностичних маркерів. Водночас слід зазначити, що наші результати при зіставленні з даними тестувань аналогічних маркерів у науковій літературі (але для пухлин інших локалізацій) свідчать про їх інформативність і клінічну значущість.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wadhwa R, Song S, Lee J-S, *et al.* Gastric cancer — molecular and clinical dimensions. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; **10**: 643–55.
2. Bidard F-C, Pierga J-Y, Soria J-C, Thiery JP. Translating metastasis-related biomarkers to the clinic — progress and pitfalls. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; **10**: 169–79.
3. McShane LM. Reporting of tumor marker studies. *Connection* 2008; **12**: 62–6.
4. Locker Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, *et al.* For the American Society of clinical oncology tumor markers expert panel. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 1865–78.
5. Riley RD, Abrams KR, Sutton AJ, *et al.* Reporting of prognostic markers: current problems and development of guidelines for evidence-based practice in the future. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1191–8.
6. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, *et al.* Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005; **97**: 1180–4.
7. Dawson B, Trapp RG. Basic and clinical biostatistics. McGraw-Hill, 2001. 399 p.
8. Осинський ДС. Фактор росту ендотелія судин як фактор прогнозу перебігу захворювання у хворих на рак шлунка. *Шпитальна хірургія* 2008; (1); 20–3.

9. Меренцев СП, Лисняк ИА, Осинский ДС, Сергиенко ТК. Уровень фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови больных раком желудка. Онкология 2007; **9** (1): 21–4.

10. Бубновська ЛМ, Ковельська АВ, Болдескул ІЄ та ін. Рівень гіпоксії у тканині раку шлунка та перебіг захворювання. Онкология 2009; **11**: 39–44.

11. Ковельська А, Гуменюк Л, Осинський Д та ін. Показники ангиогенезу у тканині раку шлунка людини та їх клінічне значення. Онкология 2012; **14**: 286–92.

12. Антонов ЄО, Гуменюк ЛД, Мамонтова ЛА, Осинський ДС. Пухлинні клітини у регіонарних лімфатичних вузлах хворих на рак шлунка з категорією N₀ та їх клінічне значення. Онкология 2013; **15** (3): 230–4.

13. Bubnovskaya L, Kovelskaya A, Gumenyuk L, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with tumor hypoxia and clinical relevance. J Oncol 2014; **2014**, ID 582140: 1–7.

14. Бубновська ЛМ, Михайленко ВМ, Ковельська АВ та ін. Визначення концентрації фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка за допомогою ³¹P ЯМР спектроскопії. Лучевая диагностика, лучевая терапия 2014; (3–4): 20–7.

15. Осинський ДС, Осинський СП. Дисеміновані пухлинні клітини у кістковому мозку хворих на рак шлунка: зв'язок з гіпоксією первинної пухлини та з виживаністю хворих. Укр мед часопис 2014; (6): 134–7.

16. Осинський ДС, Бубновська ЛМ, Ковельська АВ, Меренцев СП. Зв'язок між рівнем гіпоксії тканини раку шлунка та результатами лікування хворих. Онкология 2014; **16** (4): 283–87.

17. Гуменюк ЛД, Осинський ДС, Бубновська ЛМ та ін. Імуногістохімічна оцінка експресії c-MYC в тканині раку шлунка: зв'язок із показниками мікрооточення, дисемінованими пухлинними клітинами та виживаністю. Онкология 2015; **17** (1): 31–7.

18. Осинський ДС, Ковельська АВ, Бубновська ЛМ та ін. Зв'язок CD8- та CD45RO-позитивних Т лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, з гіпоксичним профілем раку шлунка, дисемінованими пухлинними клітинами та перебігом захворювання. Укр мед часопис 2015; (1): 74–8.

19. Osinsky S, Kovelskaya A, Bubnovskaya L, et al. CD8 and CD45RO T lymphocytes in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with disseminated tumor cell and disease outcome. Exp Oncol 2015; **37** (1): 48–52.

20. Osinsky D, Kovelskaya A, Bubnovskaya L, et al. CXCR4 expression in gastric cancer and bone marrow: association with hypoxia-regulated indices, disseminated tumor cells and patients survival. J Cancer Res 2015; **2015**, ID 980214: 1–8.

21. Epstein RJ. TNM: therapeutically not mandatory. Eur J Cancer 2009; **45**: 1111–6.

22. Lastraioli E, Boni L, Raffaella M, et al. VEGF-A clinical significance in gastric cancer: immunohistochemical analysis of a wide Italian cohort. Eur J Surg Oncol 2014; **40** (10): 1291–8.

23. Mohri Y, Tanaka K, Ohi M, et al. Prognostic significance of host- and tumor-related factors in patients with gastric cancer. World J Surg 2010; **34**: 285–90.

24. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. Cell 2010; **140**: 883–9.

25. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. Front Immunol 2012; **2**: Article 98.

26. Lee S, Oh SY, Kim SH, et al. Prognostic significance of neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX chemotherapy. BMC Cancer 2013; **13**: 350.

27. Gipponi M. Clinical applications of sentinel lymph-node biopsy for the staging and treatment of solid neoplasms. Minerva Chir 2005; **60**: 217–33.

28. Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. Cancer 1997; **79**: 1069–76.

29. Horstmann O, Fuzesi L, Markus PL, et al. Significance of isolated tumor cells in lymph nodes among gastric cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol 2004; **130**: 733–40.

30. Deng J, Liang H, Sun D, Pan Y. The prognostic analysis of lymph node-positive gastric cancer patients following curative resection. J Surg Res 2010; **161**: 47–53.

31. Deng J, Liang H, Sun D, Pan Y. Prognostic significance of immunohistochemical micrometastases in node negative gastric cancer patients. J Surg Oncol 2000; **73**: 153–7.

32. Lee E, Chae Y, Kim I, et al. Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. Cancer 2002; **94**: 2968–73.

33. Yasuda K, Adachi Y, Shiraiishi N, et al. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. Ann Surg Oncol 2002; **9**: 771–4.

34. Fukagawa T, Sasako M, Man GB, et al. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric cancer. Cancer 2001; **92**: 753–60.

CLINICAL AND PROGNOSTIC RELEVANCE OF HYPOXIA-ASSOCIATED FACTORS OF TUMOR MICROENVIRONMENT

S.P. Osinsky, L.N. Bubnovskaya, D.S. Osinsky, A.V. Kovelskaya, L.D. Gumenyuk, V.M. Mikhailenko, S.P. Merentsev, E.A. Antonov

Summary. Aim: To evaluate the prognostic relevance of hypoxia-associated factors that have been determined in our preliminary studies and to propose definite recommendations concerning the possibility to put them into the clinical practice as prognostic markers and disease outcome. **Methods:** 380 patients with primary gastric cancer that were treated by operation alone were included into the study. ³¹P NMP spectroscopy, immunofluorescence, immunocytochemical, immunohistochemical, clinical and statistical methods have been used. **Results:** It has been provided the analysis of the indexes of tumor microenvironment associated with intratumoral hypoxia and shown their clinical relevance. **Conclusion:** It was working out the test-system for prognosis disease outcome of the patient with gastric cancer.

Key Words: gastric cancer, hypoxia-associated factors, disease outcome.

Адреса для листування:

Бубновська Л.Н.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: osinskysp12@ukr.net

Одержано: 07.09.2015