

Л.М. Бубновська  
 А.В. Ковельська  
 І.Є. Болдескул  
 Д.С. Осинський  
 С.П. Меренцев  
 І.В. Гончарук  
 Г.П. Олійниченко  
 С.П. Осинський

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

Інститут прикладної фізики НАН України

ДУ «Національний інститут раку»

Київська онкологічна лікарня МОЗ України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак шлунка, гіпоксія,  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопія, метаболічне співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$ , прогностичне значення.

## РІВЕНЬ ГІПОКСІЇ У ТКАНИНІ РАКУ ШЛУНКА ТА ПЕРЕБІГ ЗАХВОРЮВАННЯ

**Резюме.** У роботі вперше проведений порівняльний аналіз рівня гіпоксії тканини злоякісних пухлин шлунка та шийки матки людини, визначеного за допомогою  $^{31}\text{P}$  ядерної магнітної резонансної спектроскопії та імуногістохімічного методу з використанням моноклональних антитіл, а саме ендogenous маркера гіпоксії — CA-9. Виявлено, що рак шлунка людини є помірно-гіпоксичною пухлиною. Встановлені особливості оксигенації пухлин та її зв'язок із клінічними показниками процесу. За рівнем гіпоксії виділені 3 групи пухлин шлунка: значення  $\text{PME}/\text{Pi}$  пухлини  $< 1,0$ ;  $1,0 < \text{PME}/\text{Pi} < 2,0$  і  $\text{PME}/\text{Pi} > 2,0$ . Такий розподіл має як прогностичне значення ( $p < 0,05$ ), так і може слугувати за додатковий критерій вибору методу лікування. Отримані дані підтвердили правомірність використання метаболічного співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$  як надійного показника рівня гіпоксії тканини.

Гіпоксія (Гокс) розглядається як ключовий фактор у патогенезі пухлини та як один з головних чинників злоякісної прогресії. Існують експериментальні та клінічні докази того, що гіпоксична фракція солідних пухлин стимулює їх ріст та метастатичний потенціал і зменшує чутливість до іонізуючої радіації та певних хімотерапевтичних препаратів [1, 2]. Продемонстровано низкою досліджень, що низька величина парціального тиску кисню ( $p\text{O}_2$ ), тобто високий рівень Гокс та підвищення рівня експресії Гокс-асоційованих білків у пухлині вказують на несприятливий перебіг захворювання [3, 4]. На підставі клінічних спостережень висловлені пропозиції щодо використання Гокс-регульованих білків у якості прогностичних маркерів [5–7].

Гокс оцінюється на підставі прямого вимірювання величини  $p\text{O}_2$  у пухлині за допомогою полярографічних мікроелектродів, що служить своєрідним золотим стандартом визначення статусу оксигенації біологічних тканин [8, 9]. У той же час цей метод має певні обмеження, головне з яких пов'язане з недоступністю багатьох пухлин для введення мікроелектродів. Існують імуногістохімічні (ІГХ) методи оцінки Гокс за допомогою визначення експресії низки Гокс-регульованих білків, зокрема HIF-1 $\alpha$  (гіпоксія-індукований фактор 1- $\alpha$ ), CA-9 (карбоангідраза-9), Glut-1 (транспортер глюкози-1), які позначаються як ендogenous маркери Гокс [9]. Використовуються також екзогенні маркери, до яких належить пімонідазол, який після введення в організм накопичується у тканинах з низьким рівнем оксигенації та метаболізує у субстанцію, яка фіксується ІГХ-методом [11].

Використання ендogenous маркерів набуло широкого розповсюдження, але вони не завжди регулюються виключно Гокс і тому не завжди чітко корелюють з рівнем останньої у тканині і не здатні розрізнити гостру Гокс від хронічної [10]. Застосування пімонідазолу, який фіксує наявність важливої з точки зору реакції пухлини на терапію так званої радіобіологічної гіпоксичної фракції пухлинних клітин, обмежується необхідністю його внутрішньовенного введення до оперативного втручання або взяття біопсії [10, 11].

В останні десятиріччя поширення набула ядерно-магнітно-резонансна (ЯМР) спектроскопія як зручний та інформативний метод дослідження *in vitro* та *in vivo*. Останній метод в поєднанні з ЯМР-зображенням широко застосовується в біології та медицині і дає можливість неінвазивно визначати місце знаходження та об'єм пухлини, здійснювати моніторинг динаміки цілої низки важливих метаболітів і при їх зміні оцінювати ефективність запровадженої терапії та попереджати рецидиви [12–14]. Більшість робіт з ЯМР-спектроскопії *in vivo* стосується досліджень хворих на рак молочної залози, передміхурової залози [15], товстої кишки [16], з пухлинами мозку [15], нейробластомою [17], саркомою м'яких тканин [18], пухлинами голови та ший [19].

При дослідженнях *in vitro* метод  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії дозволяє проаналізувати рівень у клітині всіх фосфоровмісних сполук, включаючи фракцію водорозчинних фосфоліпідів, при цьому  $^1\text{H}$  ЯМР-спектри дають можливість оцінити рівні таких важливих сполук, як лактат, холін та холінпохідні сполуки, які є та-

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

кож маркерами пухлинної прогресії [20–22]. За допомогою метаболічних показників є можливість оцінити біоенергетичний статус пухлинної тканини, а оскільки метаболічний обмін у тканині адаптується до рівня її оксигенації, то зміни цих показників свідчать про рівень Гокс [23, 24]. Об'єктом досліджень при  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії *in vitro* можуть слугувати перхлорні екстракти тканин або клітин, самі клітини, кров, а також екстракти клітин або тканин, отриманих за допомогою органічних розчинників.

Добре відомо, що існує міцний взаємозв'язок між біоенергетикою та оксигенацією в пухлинній тканині. Вивчаючи біоенергетику та метаболічний статус тканини фібросаркоми (FsaII) мишей за допомогою  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії, було встановлено, що співвідношення  $\text{Pi}/\text{PCr}$ ,  $\text{Pi}/\beta\text{NTP}$  корелюють з медіаною  $\text{pO}_2$  [24] і є загальноновизнаними для оцінки енергетичного статусу і рівня Гокс у тканині, збільшення яких свідчить про погіршення стану її оксигенації [25]. Проте оскільки у клінічній практиці, як правило, фахівці мають справу з розвиненими пухлинами, у яких рівні  $\text{PCr}$  і/або  $\beta\text{NTP}$  часто знижуються до не вимірюваних величин, що є взагалі характерним для пухлинної тканини, для оцінки біоенергетичного статусу тканини і рівня її Гокс вельми цінним є такий метаболічний показник, як  $\text{PME}/\text{Pi}$ , який є дуже чутливим до рівня тканинної оксигенації. Більше того, визначена достовірна кореляція ( $p < 0,001$ ) між середнім значенням  $\text{pO}_2$  і відповідним значенням цього співвідношення, що вперше було встановлено в експерименті з фібросаркомою FsaII у мишей [24].

Метою даної роботи була спроба оцінити стан оксигенації тканини раку шлунка (РШ) за допомогою  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії з використанням співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$  у якості показника рівня Гокс пухлини та виявити взаємозв'язок між величиною цього співвідношення та перебігом захворювання.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Було обстежено 118 хворих із діагнозом первинний РШ, яких піддавали тільки хірургічному втручанню. Пухлинну та слизову тканину шлунка, яку видаляли на певній відстані від краю пухлини, отримували під час операції. Оцінка рівня Гокс проводилася за допомогою ЯМР-спектроскопії в перхлорних екстрактах тканини. Клінічні характеристики хворих на РШ наведені у табл. 1.

Крім того, у якості своєрідного контролю достовірності визначення рівня Гокс пухлини за допомогою співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$  була використана тканина раку шийки матки (РШМ) (34 хворих), тому що ця пухлина характеризується високим рівнем Гокс. Всі дослідження проведені у період 2004–2007 рр. Матеріал був наданий відділеннями абдомінальної онкології та гінекології Інституту онкології АМН України (нині ДУ «Національний інститут раку») та Київською міською онкологічною лікарнею МОЗ України. Всі хворі були поінформовані про обстеження та дали свою згоду.

**ЯМР-спектроскопія.**  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри перхлорних екстрактів (ПХЕ) реєстрували на спектрометрі Bruker 400 MHz (Widebore Ultrashield, AV-400 electronics, ФРН), використовуючи 5 мм кювети.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри вимірювали при 161,976 MHz, зі спектральною шириною в 64724,9 Hz,  $90^\circ$  шириною імпульсу, лінійним розширенням 10 Hz. Кількість сканів у середньому по спектрах складала 1024. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma) слугувала внутрішнім стандартом. Усі  $^{31}\text{P}$  хімічні зрушення у спектрах були співвіднесені до сигналу фосфокреатину (PCr), який був позначений як 0,0 ppm.

Таблиця 1

Характеристика хворих, включених у дослідження	
Показник	Кількість хворих (%)*
Вік, роки: середнє (розподіл)	57 (31–80)
Чоловіки	70 (59)
Жінки	48 (41)
Категорія pT	
T1	1 (1)
T2	16 (14)
T3	70 (59)
T4	31 (26)
Категорія pN	
N0	46 (39)
N1	40 (34)
N2	32 (27)
Стадія TNM	
I	13 (11)
II	27 (23)
III	46 (39)
IV	32 (27)
Локалізація пухлини	
Верхня третина шлунка	25 (21)
Середня третина	34 (29)
Нижня третина	55 (47)
Тотальне ураження	4 (3)
Гістологічна структура	
Аденокарцинома	93 (79)
Слизивий рак	7 (6)
Персневидно-клітинний рак	7 (6)
Недиференційований рак	11 (9)
Ступінь диференціювання	
G1	2 (2)
G2	21 (18)
G3	66 (56)
G4	29 (24)
Віддалені метастази	
Відсутні (M0)	106 (90)
Присутні (M1)	12 (10)
ВСЬОГО	118 (100)

\*За винятком характеристики за віком.

Резонансні сигнали фосфорвмісних сполук на  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрах перхлорних екстрактів пухлинної тканини мають наступний порядок розміщення: фосфомоефіри (PME): фосфоетаноламін (PE) і фосфохолін (PC), нуклеозид монофосфат (AMФ), та фосфорильовані інтермедіати гліколізу; фосфор неорганічний (Pi); фосфодиефіри (PDE): гліцерофосетаноламін (GPE) і гліцерофосфохолін (GPC); фосфокреатин (PCr);  $\gamma$ -NTP і нуклеозид дифосфат  $\beta$ -фосфат;  $\alpha$ -NTP і нуклеозид дифосфат,  $\alpha$ -фосфат разом з іншими різними сполуками, такими як NADPH/NADP<sup>+</sup> і NADH/NAD<sup>+</sup>; дифосфодиефіри, вірогідно уридін дифосфоглюкоза; та  $\beta$ NTP (ATФ).  $\beta$ -фосфатний резонанс нуклеозид трифосфата (NTP) використовується для оцінки рівня ATФ [24]. Області спектральних сигналів на спектрах вимірювалися інтегральним способом, які обчислював

прилад.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри були отримані в Центрі загального користування НАН України на базі Інституту металофізики НАН України.

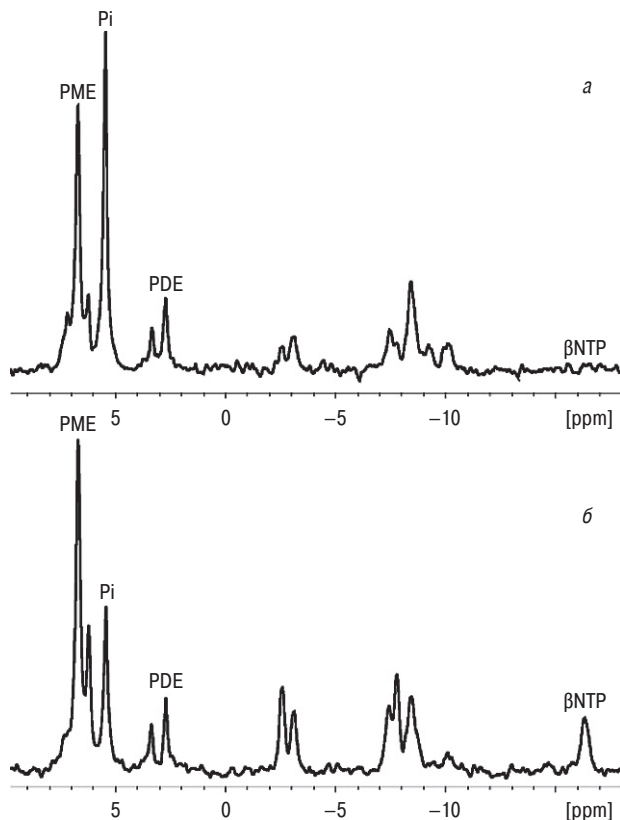
**ПХЕ тканини.** Для отримання ПХЕ тканину видаляли і негайно занурювали у рідкий азот. Потім її розтирали в рідкому азоті до порошковидного стану, давали трохи відтаяти. Подалі проводили екстракцію за допомогою холодної 1,2 н  $\text{HClO}_4$ . Холодну деіонізовану воду додавали в певному обсязі та інкубували на льоду при постійному помішуванні. Центрифугували для видалення клітинного дебрису. Потім рН ПХЕ доводили до 7,6–8,0 за допомогою 5 н розчину  $\text{KOH}$ , центрифугували для видалення  $\text{KClO}_4$  преципітату. Дивалентні іони видаляли за допомогою  $\text{Chelex 10}$  мг/5 мл (Sigma, США). Зразки фільтрували, ліофілізували та зберігали при  $-20^\circ\text{C}$ . Перед реєстрацією ЯМР-спектрів, зразки розчиняли в 1,0 мл  $\text{D}_2\text{O}$ , центрифугували і переносили в ЯМР-пробірки для аналізу.

**Статистична обробка.** Проводили відповідну статистичну обробку отриманих результатів: кореляційний аналіз з використанням коефіцієнтів Pearson ( $r$ ) та Spearman ( $\rho$ ). Прогностичне значення показників оцінювали за допомогою пропорційної моделі Cox з використанням коефіцієнта ризику смертності (hazard ratio) та теста  $\chi^2$ . Вживаність хворих визначалася за методом Kaplan — Maier, розбіжності між кривими вживаності аналізували за допомогою теста log-rank. Статистична значимість прийнята при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз спектрів ПХЕ тканини РШ встановив, що вміст  $\text{PCr}$  та  $\beta\text{NTP}$  був значно знижений в тканині РШ (у 3,2 та 2,5 раза відповідно) щодо слизової оболонки, яка оточує пухлину. Типові  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри представлені на рис. 1. Таке зниження рівнів  $\text{PCr}$  і  $\beta\text{NTP}$  відбувалося з одночасним зростанням сигналу  $\text{Pi}$ , що втілюється у зміні відповідних співвідношень:  $\text{Pi}/\text{PCr}$  було збільшеним у пухлині у 4,5 раза порівняно з нормальною слизовою оболонкою,  $\text{Pi}/\beta\text{NTP}$  — у 3 рази. Підвищення цих співвідношень свідчить про погіршення стану оксигенації і, таким чином, про значне підвищення рівня Гокс у пухлині. При проведенні кореляційного аналізу було встановлено, що між співвідношенням  $\text{Pi}/\beta\text{NTP}$  та  $\text{PME}/\beta\text{NTP}$  у тканині РШ існує дуже тісний взаємозв'язок ( $r = 0,0001$ ). Щодо співвідношення  $\text{Pi}/\text{PCr}$ , то для проведення кореляційного аналізу не було достатньо даних, тому що на  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрах тканини РШ багатьох хворих сигнали  $\text{PCr}$  були невимірно малими або зовсім не реєструвалися (у 78% випадків). Дещо кращий стан спостерігався для сигналу  $\beta\text{NTP}$ , який можливо було спостерігати на спектрах у 52% випадків. Таке становище є характерною особливістю розвинених пухлини, особливо пухлин людини, але не дає можливості використовувати загальноприйнятні  $^{31}\text{P}$  ЯМР-співвідношення, такі як  $\text{Pi}/\text{PCr}$ ,  $\text{Pi}/\beta\text{NTP}$  (або  $\text{PCr}/\text{Pi}$ ,  $\beta\text{NTP}/\text{Pi}$ ),  $\text{PME}/\beta\text{NTP}$  і, таким чином, оці-

нювати та порівнювати гіпоксичний стан пухлин усіх обстежених хворих. Тому для отримання повної інформації щодо рівня Гокс у пухлинах усіх хворих, використали метаболічне співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$ , яке може бути визначеним у кожному випадку, що дає змогу порівнювати між собою всі отримані зразки пухлинних тканин щодо рівня їх Гокс.



**Рис. 1.**  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри ПХЕ тканини РШ (а) та оточуючої її слизової оболонки (б) (подані копії спектрів з оригінальних записів, хворий Б.Л.С.)

Результати попередніх експериментальних досліджень [26], їх аналіз та співставлення з іншими методами та показниками дозволили використовувати співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$  для оцінки рівня Гокс у тканині РШ. Для підтвердження правомірності використання співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$  у роботі з клінічним матеріалом був проведений також кореляційний аналіз між цим співвідношенням та загально-визнаним метаболічним співвідношенням для оцінки енергетичного статусу та рівня Гокс у тканині, а саме з  $\text{Pi}/\beta\text{NTP}$ , отриманим зі спектрів ПХЕ тканини РШ, на яких відзначався сигнал  $\beta\text{NTP}$ . Отримана достовірна зворотня кореляція між цими співвідношеннями:  $\text{Pi}/\beta\text{NTP}$  та  $\text{PME}/\text{Pi}$  ( $r = -0,38$ ;  $p = 0,046$ ).

Визначено, що медіана співвідношення  $\text{PME}/\text{Pi}$  для тканини РШ дорівнює 1,40, тоді як для слизової оболонки, розміщеної на певній відстані від пухлини (за межами обов'язкового оперативного видалення) — 2,4. Це співвідноситься з даними літератури, які вказують, що рівень оксигенації в злоякісних пухлинах людини значно вищий за такий, визначений для експериментальних пухлин, де вона коливається близько 1,0 (також за даними, отриманими

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

за допомогою  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії ПХЕ тканин). У табл. 2 наведені значення медіани співвідношення РМЕ/Рі згідно з клініко-патологічними характеристиками РШ, з яких видно, що коливання медіани не є значними. Якщо порівнювати медіани різних метаболічних  $^{31}\text{P}$  ЯМР-співвідношень у пухлинній тканині з такими в оточуючій її «нормальній» слизовій оболонці шлунка, які наведені в табл. 3, видно, що в пухлинній тканині вони значно відрізняються (від 1,4 до 2,4 раза).

Таблиця 2

Значення співвідношення РМЕ/Рі у тканині РШ згідно з клініко-патологічними характеристиками

Показник	Середнє значення $\pm$ похибка середньої (M $\pm$ m)	Медіана
Категорія pT		
T2	1,55 $\pm$ 0,12	1,75
T3	1,46 $\pm$ 0,08	1,36
T4	1,57 $\pm$ 0,14	1,35
Категорія pN		
N0	1,49 $\pm$ 0,09	1,40
N1	1,37 $\pm$ 0,08	1,33
N2	1,67 $\pm$ 0,09	1,52
Стадія TNM		
I	1,60 $\pm$ 0,13	1,8
II	1,41 $\pm$ 0,10	1,35
III	1,52 $\pm$ 0,13	1,6
IV	1,52 $\pm$ 0,11	1,37
Гістологічна структура		
Аденокарцинома	1,49 $\pm$ 0,06	1,39
Слизовий рак	1,36 $\pm$ 0,15	1,14
Персневидно-клітинний рак	1,91 $\pm$ 0,60	1,62
Недиференційований рак	1,46 $\pm$ 0,18	1,50
Ступінь диференціювання		
G2	1,53 $\pm$ 0,15	1,44
G3	1,50 $\pm$ 0,10	1,35
G4	1,47 $\pm$ 0,10	1,56
Локалізація пухлини		
Верхня третина шлунка	1,58 $\pm$ 0,14	1,62
Середня третина	1,62 $\pm$ 0,60	1,49
Нижня третина	1,34 $\pm$ 0,06	1,19
Тотальне ураження	2,06 $\pm$ 0,37	1,78
Віддалені метастази		
Відсутні (M0)	1,51 $\pm$ 0,07	1,40
Присутні (M1–2)	1,45 $\pm$ 0,13	1,39
Загальне значення для всіх хворих	1,49 $\pm$ 0,04	1,40

Таблиця 3

Метаболічні  $^{31}\text{P}$ -співвідношення у тканині РШ та слизовій оболонці шлунка (СОШ), яка оточує пухлину

Співвідношення	Медіана	Розподіл
Тканина РШ РМЕ/Рі	1,4	0,8–5,32
СОШ РМЕ/Рі	2,4	1,58–3,8
Тканина РШ Рі/βNTP	6,14	1,1–23,0
СОШ Рі/βNTP	2,6	0,8–6,6
Тканина РШ РМЕ/βNTP	7,4	1,21–20,4
СОШ РМЕ/βNTP	5,2	1,6–9,5
Карциноїд: РМЕ/Рі		3,35

Таким чином, на підставі визначення співвідношення РМЕ/Рі можна зробити висновок, що межа розподілу між умовно «добре» та «бідно» оксигенованими пухлинами дорівнює 1,4 (0,8–5,32) для всіх обстежених хворих, що відповідає медіані вищевказаного співвідношення. У хворих, у яких співвідношення РМЕ/Рі < 1,4, пухлини «гіпоксичні», тоді як у хворих, у яких РМЕ/Рі > 1,4, — пухлини задовільно оксигеновані. Встановлено, що «гіпоксичні» пухлини шлунка складають 44%, а «оксигеновані» — 56%.

Для того, щоб пересвідчитися, що співвідношення РМЕ/Рі дійсно відображає рівень оксигенації у пухлині РШ і, що тканина РШ є дійсно досить добре оксигенованою, був проведений порів-

няльний аналіз спектрів пухлинних тканин хворих на РШ і хворих на РШМ. Остання тканина, як добре відомо, є пухлиною, що знаходиться в стані глибокої Гокс, яка виявлена за допомогою мікроелектродної техніки [27]. На відміну від  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрів РШ, на спектрах тканини РШМ характерним є більш сильний сигнал Рі, не такий виразний сигнал РМЕ і майже відсутні сигнали PDEs (рис. 2).

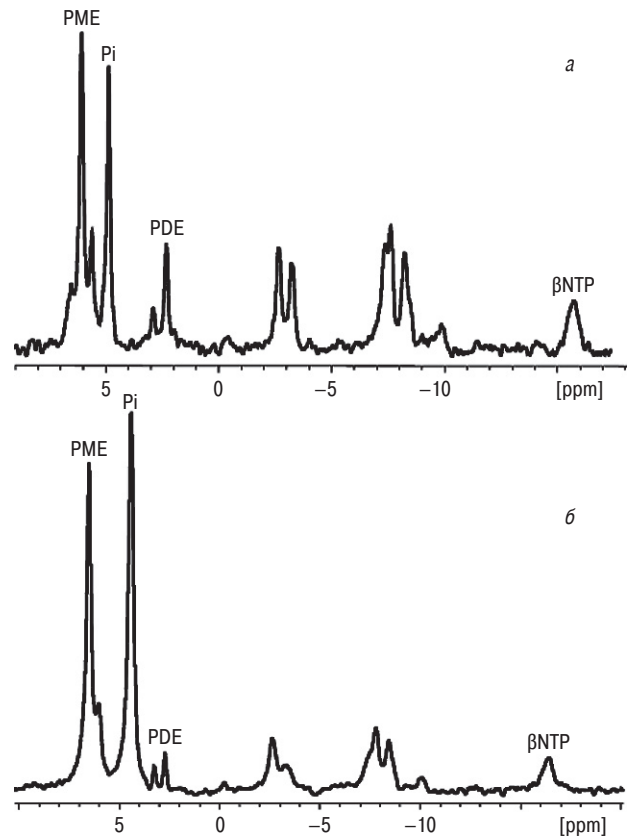


Рис. 2.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри ПХЕ тканини РШ (а) та тканини РШМ (б), (подані копії спектрів з оригінальних записів, хворі Б.В.В. та П.Н.В. відповідно)

При аналізі  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрів обох тканин було виявлено, що медіана співвідношення РМЕ/Рі для тканини РШМ досить низька, навіть менша за одиницю, а індивідуальні значення за даними розкиду не перевищують 1,0 порівняно з тканиною РШ, що підтверджує дані про високий рівень Гокс у тканині РШМ (табл. 5). Крім того, з метою порівняння рівня оксигенації в цих обох пухлинах був застосований ІГХ-метод з використанням ендogenous маркеру Гокс — СА-9. У табл. 4 наведено розподіл хворих на пухлини обох локалізацій відносно рівня експресії СА-9 у пухлинній тканині, з якої видно, що хворих на РШ, у яких відзначався високий рівень експресії значно менше, і це також вказує на підтвердження положення про існування досить задовільної оксигенації в тканині РШ. Для обох тканин були також встановлені медіани кількості клітин (у %), які експресують СА-9, та їх розкид. Виявилось, що медіана кількості клітин, які експресують СА-9, у тканині РШ значно менша, ніж у РШМ, і розкид їх у бік невеликих величин значно більший (див. табл. 5).

Таблиця 4

Порівняльний аналіз хворих на РШ та РШМ за кількістю пухлинних клітин, у яких ІГХ-методом виявлено експресію СА-9

Частота клітин у пухлині, які експресують СА-9, %*	Кількість пухлин, %	
	РШ	РШМ
< 10	11	0
11–50	39	19
> 50	50	81

\*Пухлини, клітини яких експресують СА-9, розподілені на 3 групи згідно з класифікацією Mauger і співавторів [28].

Таблиця 5

Співвідношення РМЕ/Рі та кількість клітин у тканині РШ та РШМ, у яких ІГХ-методом виявляється експресія СА-9

Пухлина	РМЕ/Рі, медіана (розподіл)	СА-9, медіана (розподіл), %
РШ	1,40 (0,80–5,32)	49,00 (0,00–96,00)
РШМ	0,84 (0,51–1,00)	64,95 (35,90–95,90)

За даними  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії індивідуальні значення співвідношення РМЕ/Рі для тканини РШМ не перевищують 1,0. Тому з метою порівняння кількості клітин (у %), які експресують СА-9 у цих новоутвореннях, була відібрана група хворих на РШ, в первинній пухлині яких спостерігався теж досить високий рівень Гокс (РМЕ/Рі < 1,0). Виявилося, що в тканині РШ за таких умов Гокс більше ніж 60,7% клітин експресують СА-9 ( $p < 0,05$ ), тоді як в інших групах значних розбіжностей виявлено не було, а саме, коли  $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 1,4$  — 39,4% і  $\text{РМЕ/Рі} > 1,4$  — 48,1%. Таким чином, можна констатувати, що співвідношення РМЕ/Рі відображає стан оксигенації тканини, а ендогенний маркер Гокс СА-9 виявляється показовим тільки тоді, коли в тканині спостерігається наявність глибокої Гокс. При аналізі отриманих даних було виявлено 3 умовні групи хворих на РШ за співвідношенням РМЕ/Рі щодо рівня Гокс у пухлині:  $\text{РМЕ/Рі} < 1,0$ ,  $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$  та  $\text{РМЕ/Рі} > 2,0$ , які склали 29, 58 та 13% хворих. При співставленні рівнів Гокс у первинних пухлинах хворих на РШ, оцінених за допомогою співвідношення РМЕ/Рі, з перебігом захворювання виявилось, що такий взаємозв'язок існує: хворі, у яких значення  $\text{РМЕ/Рі} < 1,0$ , тобто з умовно «глибокою» внутрішньопухлинною Гокс, мали особливо несприятливий прогноз перебігу захворювання, а саме в цій умовній групі вмирає кожен другий хворий, тоді як у групі з показниками  $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$  вмирає кожен з трьох, при співвідношенні  $\text{РМЕ/Рі} > 2,0$  — 2 хворих з 5.

Слід зазначити, що кореляції рівня Гокс пухлини у хворих на РШ з категоріями Т і М (система TNM) та стадіями процесу не спостерігалось. Це співпадає з відомим положенням, що Гокс пухлини не залежить від розміру новоутворення, гістологічної форми, ступеня диференціювання, обсягу некротичних ділянок, клінічної стадії, і тому її рівень може розглядатися як незалежний фактор прогнозу перебігу захворювання [29]. У той же час був встановлений важливий взаємозв'язок між високим рівнем Гокс у первинній пухлині та наявністю метастазів у лімфатичних вузлах хворих на РШ (табл. 6). У хворих, які не мають метастазів у лімфатичних вузлах (група хворих з категорією N0), але спостерігається глибо-

ка Гокс у первинній пухлині ( $\text{РМЕ/Рі} < 1,0$ ) має місце негативний перебіг захворювання і загроза смерті зростає більше, ніж вдвічі.

Таблиця 6

Співвідношення РМЕ/Рі як прогностичний фактор для хворих на РШ з категорією N0 (тільки хірургічне лікування)

N	РМЕ/Рі	Hazard ratio	95% CI	p
N0	< 1,0	2,1	0,67–4,67	< 0,035
N1–2	< 1,0	4,5	0,40–2,57	< 0,027

Аналізуючи виживаність хворих на РШ відносно співвідношення РМЕ/Рі (рис. 3), тобто залежно від рівня Гокс у первинній пухлині, було виявлено, що тривалість життя хворих, в первинній пухлині значення яких  $\text{РМЕ/Рі} < 1,4$  (глибока Гокс), коротша, ніж в групі хворих, у пухлинах яких  $\text{РМЕ/Рі} > 1,4$ .

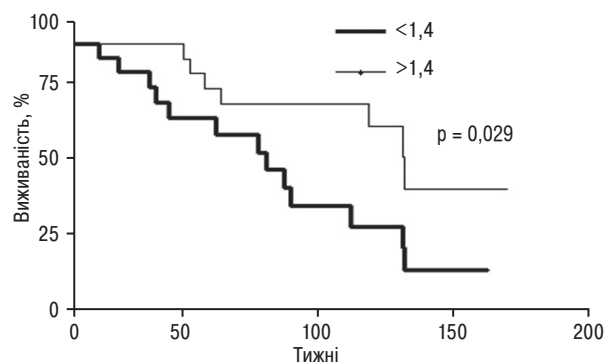


Рис. 3. Криві загальної виживаності хворих на РШ залежно від співвідношення РМЕ/Рі пухлинної тканини (оцінка виживаності за методом Каплана — Майєра)

Слід зазначити, що у 88% хворих на РШ, які померли, значення  $\text{РМЕ/Рі}$  в первинній пухлині було < 1,4, тобто спостерігалася більш глибока Гокс. Необхідно при цьому відзначити, що з 118 хворих, які були прооперовані, 62 хворих (53%) отримували післяопераційну хімотерапію. Ці дані вказують на те, що наявність глибокої Гокс у пухлинній тканині вказує на несприятливий перебіг захворювання незалежно від того, чи була після операції застосована у цих хворих хімотерапія, чи ні.

## ВИСНОВКИ

1. РШ людини є помірно-гіпоксичною пухлиною. За використаними показниками стану оксигенації можна виділити 3 групи пухлин: глибока Гокс — 29% новоутворень, помірна — 58% та слабка — 13%.

2. Рівень Гокс пухлини не корелює з традиційними клінічними характеристиками пацієнтів та пухлини.

3. У групі хворих з категорією N0 і наявністю глибокої Гокс в первинній пухлині ( $\text{РМЕ/Рі} < 1,0$ ) має місце негативний перебіг захворювання і зростає ризик смерті.

4. Глибока Гокс РШ є несприятливим прогностичним фактором незалежно від методу післяопераційного лікування.

5. Визначення величини співвідношення РМЕ/Рі у пухлинній тканині за допомогою  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії є інформативним методом оцінки рівня Гокс пухлини та може бути застосовано у клінічній практиці.

## ЛІТЕРАТУРА

1. **Brown JM, Giaccia AJ.** The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998; **58**: 1408–16.
2. **Hoeckel M, Vaupel P.** Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biological, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**: 266–76.
3. **Vaupel P, Thews O, Kelleher DK, et al.** Current status of knowledge and critical issues in tumor oxygenation. Results from 25 years research in tumor pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 1998; **454**: 591–602.
4. **Airley RE, Loncaster J, Davidson S, et al.** Glucose transporter Glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 928–34.
5. **Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, et al.** Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001; **61**: 6394–9.
6. **Le Q-T, Kong C, Lavori PW, et al.** Expression and prognostic significance of a panel of tissue hypoxia markers in head-and-neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; **69**: 167–75.
7. **Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, et al.** GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer* 2003; **104**: 85–91.
8. **Stone HB, Brown JM, Phillips TL, et al.** Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. *Radiat Res* 1993; **136**: 422–34.
9. **Hoeckel M, Schlenger K, Knoop C, et al.** Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O<sub>2</sub> tension measurements. *Cancer Res* 1991; **51**: 6098–102.
10. **Evans SM, Koch CJ.** Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett* 2003; **195**: 1–16.
11. **Bussink J, Kaanders JHAM, van der Kogel AJ.** Tumor hypoxia at the microregional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol*; **67**: 3–15.
12. **Cheng LL, Burns MA, Taylor JL, et al.** Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 2005; **65**: 3030–4.
13. **Knopp MV, Tengg-Kobligh von H, Choyke PL.** Functional magnetic resonance imaging in oncology for diagnosis and therapy monitoring. *Mol Cancer Therapeutics* 2003; **2**: 419–26.
14. **Evelhoch J, Garwood M, Vigneron D, et al.** Expanding the use of magnetic resonance in the assessment of tumor response to therapy: workshop report. *Cancer Res* 2005; **65**: 7041–5.
15. **Kwock L, Smith JK, Castillo M, et al.** Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast and prostate cancer. *Lancet Oncol* 2006; **10**: 859–68.
16. **Kasimos JN, Merchant TE, Gierke LW, et al.** <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy of human colon cancer. *Cancer Res* 1990; **50**: 527–32.
17. **Lindskog M, Spenger C, Klason T, et al.** Proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma: current status, prospects and limitations. *Cancer Lett* 2005; **228**: 247–55.
18. **Dewhirst MW, Poulson JM, Yu D, et al.** Relation between pO<sub>2</sub>, <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy parameters and treatment outcome in patients with high-grade soft tissue sarcomas treated with thermoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; **61**: 480–91.
19. **Maldonado X, Alonso J, Giralt J, et al.** <sup>31</sup>P phosphorus magnetic resonance spectroscopy in the assessment of head and neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; **40**: 309–12.
20. **Leach MO.** Introduction to in vivo MRS of cancer: new perspectives and open problems. *Anticancer Res* 1996; **16**: 1503–14.
21. **Zakian KL, Shukla-Dave A, Meyers P, et al.** Identification of prognostic markers in bone sarcomas using proton-decoupled phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 2003; **63**: 9042–7.
22. **Baek H-M, Chen J-H, Nalcioglu O, et al.** Proton MR spectroscopy for monitoring early treatment response of breast cancer to neo-adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 2008; **19**: 1022–4.
23. **Rofstad EK, DeMuth P, Fenton BM, et al.** <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of tumor energy metabolism and its relationship to intracapillary oxyhemoglobin saturation status and tumor hypoxia. *Cancer Res* 1988; **48**: 5440–6.
24. **Vaupel P, Okunieff P, Kallinowski F, et al.** Correlation between <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and tissue O<sub>2</sub> tension measurements in a murine fibrosarcoma. *Radiat Res* 1989; **120**: 477–93.
25. **Li S-J, Wehrle JP, Rajan SS, et al.** Response of radiation-induced fibrosarcoma-1 in mice to cyclophosphamide monitored by *in vivo* <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 1988; **48**: 4736–42.
26. **Bubnovskaya L, Mikhailenko V, Kovelskaya A, Osinsky S.** Bioenergetic status and hypoxia in Lewis lung carcinoma assessed by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy: correlation with tumor progression. *Experimental Oncol* 2007; **29**: 207–11.
27. **Hoeckel M, Schlenger K, Aral B, et al.** Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996; **56**: 4509–15.
28. **Mayer A, Hockel M, Vaupel P.** Carbonic anhydrase IX expression and tumor oxygenation status do not correlate at the microregional level in locally advanced cancers of the cervix. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 7220–5.
29. **Wouters BG, Weppeler SA, Koritzinsky M, et al.** Hypoxia as a target for combined modality treatments. *Eur J Cancer* 2002; **38**: 240–57.

## HYPOXIA LEVEL IN GASTRIC CANCER AND DISEASE OUTCOME

*L.M. Bubnovskaya, A.V. Kovelskaya, I.E. Boldeskuł, D.S. Osinsky, S.P. Merentsev, I.V. Goncharuk, G.P. Olijnichenko, S.P. Osinsky*

**Summary.** Comparative analysis of tissue hypoxia level in human gastric cancer with such in human cervical cancer has been provided by means of <sup>31</sup>P NMR spectroscopy and immunohistochemistry using monoclonal antibody namely endogenous hypoxia marker CA 9. It was revealed that gastric cancer is the tumor with moderate level of hypoxia. It was determined the peculiarities of tumor oxygenation and its link with clinical characteristics. According to tumor hypoxia level it has been revealed three groups of gastric neoplasia: metabolic ratio PME/Pi < 1,0; 1,0 < PME/Pi < 2,0 and PME/Pi > 2,0 that has not only prognostic significance (p < 0,05), but may be as additional criterion for choice of treatment methods. It was confirmed that <sup>31</sup>P metabolic ratio PME/Pi may be used as reliable parameter for assessment of tissue hypoxia.

**Key Words:** gastric cancer, hypoxia, <sup>31</sup>P NMR spectroscopy, metabolic ratio PME/Pi, prognostic significance.

### Адреса для листування:

Осинський С.П.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
E-mail: osion@onconet.kiev.ua