

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ СПІВВІДНОШЕНЬ У ТКАНИНІ РАКУ ШЛУНКА ЛЮДИНИ, ВИЗНАЧЕНИХ ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЄЮ ПЕРХЛОРНИХ ЕКСТРАКТІВ

Л.М. Бубновська¹, А.В. Ковельська¹, І.Є. Болдескул², Г.П. Олійніченко³, С.П. Осинський¹

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

²Інститут прикладної фізики НАН України,

³Міська онкологічна лікарня МОЗ України, м. Київ

Одним із перспективних напрямків досліджень, спрямованих на підвищення ефективності протипухлинної терапії, є роботи з визначення молекулярного профілю пухлини у кожного окремого хворого з метою індивідуалізації його лікування [25]. Серед біологічних характеристик злякисного новоутворення особливе місце посідає гіпоксія пухлини, тобто низький рівень оксигенації, спричинений незадовільним з точки зору анатомії та фізіології судинним руслом пухлини [4]. Існують численні експериментальні та клінічні докази того, що гіпоксія солідних пухлин впливає на їх ріст, посилює злякисну прогресію, зокрема метастатичний потенціал, зменшує чутливість до хімотерапевтичних заходів та іонізуючої радіації [30—32].

Гіпоксія розглядається сьогодні як ключовий фактор патогенезу злякисних новоутворень. Показано, що низька величина парціального тиску кисню (pO_2), тобто високий рівень гіпоксії, та підвищення рівня експресії гіпоксія-асоційованих білків у пухлині вказують на несприятливий перебіг захворювання [23]. Результати клінічних спостережень дозволили запропонувати використання рівня гіпоксії та наявності експресії гіпоксія-асоційованих білків як прогностичних маркерів [5,8,20,21]. Традиційно гіпоксія оцінюється прямим вимірюванням величини pO_2 у тканині полярографічними мікроелектродами, що слугує за своєрідний стандарт визначення рівня оксигенації біологічних тканин [4]. Але цей метод має певні обмеження, головне з яких пов'язане з недоступністю багатьох пухлин для введення мікроелектродів. Існують імуногістохімічні (ІГХ) методи оцінки рівня гіпоксії за допомогою визначення експресії екзогенних та ендогенних маркерів гіпоксії. До перших відноситься пімонідазол, який після введення в організм накопичується у тканинах з низьким рівнем оксигенації і метаболізує у субстанцію, яка фіксується ІГХ методом [11]. Цей метод обмежується необхідністю внутрішньовенного введення пімонідазолу до оперативного втручання або взяття біопсії. Використання ендогенних маркерів, до яких відносяться так

звані гіпоксія-асоційовані білки, набуло широкого розповсюдження, але вони не завжди регулюються виключно рівнем оксигенації [11,15].

Спільне використання магнітно-резонансної томографії (МРТ) та магнітно-резонансної спектроскопії (МРС) дозволяє *in vivo* неінвазивно визначати локалізацію, розповсюдження, об'єм пухлини, відносний рівень низки метаболітів та за змінами їх рівня оцінювати ефективність протипухлинної терапії [13,16,22].

При дослідженнях *in vitro* метод ^{31}P МРС дозволяє проаналізувати рівень у клітині всіх фосфорвмісних сполук, включаючи фракцію водорозчинних фосфоліпідів. Об'єктом досліджень при ^{31}P МРС *in vitro* можуть слугувати перхлорні екстракти (ПХЕ) тканин або клітин, самі клітини та кров. Рівень певних метаболічних показників дозволяє оцінити біоенергетичний статус тканини, а оскільки метаболічний обмін тканини адаптується до рівня її оксигенації, то зміни цих показників свідчать про рівень гіпоксії [28,33,34].

1H МРС дає можливість оцінити рівні таких важливих сполук, як лактат, холін та холінпохідні метаболіти, які є маркерами пухлинної прогресії [9,19,40].

Мета роботи: довести можливість оцінки стану оксигенації пухлини та визначення рівня лактату у тканині за допомогою ^{31}P та 1H МРС, відповідно, та встановити клінічне значення зазначених показників як прогностичних маркерів.

Матеріал та методи. Обстежено 118 хворих з діагнозом первинний рак шлунка (РШ), які підлягали тільки хірургічному втручання. Пухлинну та слизову тканину шлунка, яку видаляли на певній відстані від краю пухлини (за межами обов'язкового оперативного видалення), отримували під час операції і миттєво занурювали в рідкий азот. Оцінка рівня гіпоксії та рівня лактату проводилася за допомогою МРС у перхлорних екстрактах тканини. Клінічні характеристики хворих на РШ наведені в табл. 1.

Як своєрідний контроль достовірності визначення рівня гіпоксії пухлини була використана тка-

Таблиця 1

Характеристика хворих на рак шлунка

Показник	Кількість хворих	
	абс.	%
Вік (в роках; середнє, розподіл)	57	31-80
Чол.	70	59
Жін.	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	36	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
Слизовий 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	10

нина раку шийки матки (РШМ) (34 хворих), яка характеризується високим рівнем гіпоксії (матеріал був наданий Інститутом онкології АМН України). Всі хворі були поінформовані про обстеження та надали свою згоду.

MP-спектри перхлорних екстрактів (ПХЕ) реєстрували на спектрометрі Bruker 400 MHz (Widebore Ultrashield, AV-400 electronics, ФРН), використовуючи 5 мм кювети.

³¹P MP-спектри вимірювали при 161,976 MHz, зі спектральною шириною в 64724,9 Hz, 90° шириною імпульсу, затримкою 4 с, лінійним розширенням 10 Hz. Кількість сканів у середньому по спектрам становила 1024. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma, США) слугувала внутрішнім стандартом. Усі ³¹P хімічні зрушення у спектрах були співвіднесені до сигналу фосфокреатину (PCr), який був позначений як 0,00 ppm.

Резонансні сигнали фосфоровмісних сполук на ³¹P MP-спектрах перхлорних екстрактів тканини мають наступний порядок розміщення: фосфомоноєфіри (PME): фосфоетаноламін (PE) і фосфохолін (PC), нуклеозид монофосфат (АМФ) та фосфорильовані інтермедіати гліколізу; фосфор неорганічний (P_i); фосфодієфіри (PDE): гліцерофосфоетаноламін (GPE) та гліцерофосфохолін (GPC); фосфокреатин (PCr); γ-NTP і нуклеозид дифосфат β-фосфат; α-NTP і нуклеозид дифосфат α-фосфат разом з іншими сполуками, такими як NADPH/NADP⁺, NADH/NAD⁺; дифосфодієфіри, вірогідно уридин дифосфоглюкоза; та β-NTP. β-фосфатний резонанс нуклеозид трифосфату (NTP) використовується для оцінки рівня АТФ [34].

¹H MP-спектри вимірювали при 400,13 MHz, зі спектральною шириною в 8250 Hz та 90° шириною імпульсу, затримкою 20 с, лінійним розширенням 0,3 Hz. Натрієва сіль 3-(триметилсіліл)пропіонової кислоти (0,75% розчин в D₂O, Sigma, США) слугувала за внутрішній стандарт. За таких умов резонансні сигнали лактату (Lac) та креатину (Cr) на ¹H MP-спектрах реєструються на 1,3 та 3,06 ppm відповідно.

Області спектральних сигналів на спектрах вимірювалися інтегральним способом, які обчислював прилад. MP-спектри були отримані в Центрі загального користування НАН України на базі Інституту металофізики НАН України.

Для отримання ПХЕ тканину видаляли і негайно занурювали в рідкий азот. Потім її розтирали до порошкоподібного стану, давали трохи відтаяти. Подалі проводили екстракцію за допомогою холодної 1,2 н HClO₄. 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 5н розчину КОН, центрифугували для видалення KClO₄ преципітату. Дивалентні іони видаляли за допомогою Chelex 10мг/5мл (Sigma, США). Зразки фільтрували, ліофілізували та зберігали при — 20°C. Перед реєстрацією MP-спектрів зразки розчиняли в 1,0 мл D₂O, центрифугували і переносили в MP-пробірки для подальшого аналізу.

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

Результати та їх обговорення. При встановленні первинного діагнозу РШ визначити рівень того чи іншого метаболіту в пухлині, який може бути маркером перебігу захворювання, без отримання принаймні біопсійного матеріалу, неможливо. Для того, щоб пересвідчитися, чи можливо за допомогою МР метаболічних показників оцінити рівень гіпоксії в РШ і чи може бути серед них такий, який би мав прогностичне значення, була використана МРС ПХЕ тканини РШ і слизової оболонки шлунка.

³¹P МРС визначення рівня гіпоксії у тканині

В МРС біологічних об'єктів користуються так званими метаболічними співвідношеннями, а саме співвідношеннями інтегралів резонансних сигналів речовин, що відображують взаємозв'язок цих речовин у зразку тканини.

Було встановлено, що співвідношення Pi/PCr , $Pi/\beta NTP$ (або PCr/Pi , $\beta NTP/Pi$), $PME/\beta NTP$, де Pi — фосфор неорганічний, PCr — фосфокреатин, βNTP — β -аденозинтрифосфат, PME — фосфомоноєфіри, корелюють з величиною pO_2 , що дозволило їх використовувати для оцінки енергетичного статусу тканини і рівня її гіпоксії [28,34]. У клінічній практиці фахівці мають справу з розвиненими пухлинами, в яких рівні PCr та/або βNTP часто знижуються до невимірюваних величин. За таких умов для оцінки біоенергетичного статусу і рівня гіпоксії тканини інформативним є співвідношення PME/Pi , тому що фосфомоноєфіри дуже чутливі до рівня тканинної оксигенації. Визначена достовірна кореляція між величиною pO_2 та цим співвідношенням [34].

Проведений нами аналіз спектрів ПХЕ тканини РШ показав, що рівні PCr та βNTP значно знижені у пухлині щодо слизової оболонки, яка оточує пухлину. Зниження сигналів високоенергетичних фосфатів, а саме — PCr і βNTP з одночасним зростанням сигналу Pi втілюється у зміну відповідних співвідношень: Pi/PCr і $Pi/\beta NTP$ були збільшеними у пухлині порівняно зі слизовою оболонкою в 4,5 і 3 рази відповідно, що свідчить про погіршення стану її оксигенації. Типові ³¹P МР-спектри представлені на рис. 1. Слід зазначити, що на ³¹P МР-спектрах пухлин сигнал PCr був невимірним у 78% хворих, а сигнал βNTP реєструвався у 52% випадків. Такі дані є характерними для розвинених пухлин, які, як правило, спостерігаються у клінічній практиці. Таке становище не давало змоги використовувати загальноприйняті співвідношення для оцінки гіпоксичного стану пухлин обстежених хворих. Тому для оцінки рівня гіпоксії у пухлинах усіх хворих було використано метаболічне співвідношення PME/Pi , яке є дуже чутливим до рівня тканинної оксигенації. Існує достовірна кореляція ($p < 0,001$) між середньою величиною pO_2 і відповідним значенням цього співвідношення, що вперше було встановлено в експерименті з фібросаркомою Fsal1 у мишей [34]. Співвідношення PME/Pi може бути визначеним у кожному випадку, що дає змогу порівнювати між собою всі отримані зразки пухлинних тканин щодо рівня їх гіпоксії.

Результати наших попередніх експериментальних робіт [1], їх аналіз та співставлення з даними інших досліджень дозволили використовувати співвідношення PME/Pi для оцінки рівня гіпоксії у тканині РШ. Для підтвердження правомірності використання співвідношення PME/Pi був проведений кореляційний аналіз між цим співвідношенням та загальноновизнаним метаболічним співвідношенням, яке використовується для оцінки енергетичного статусу та рівня гіпоксії в тканині, а саме з $Pi/\beta NTP$, яке отримувалось зі спектрів ПХЕ тканини РШ, на яких спостерігався сигнал βNTP . Була отримана достовірна зворотна кореляція між цими співвідношеннями: $Pi/\beta NTP$ та PME/Pi ($r = -0,38$; $p = 0,046$).

У клінічних дослідженнях дуже часто користуються значенням медіани того чи іншого показника як точкою розподілу хворих за групами. Медіана співвідношення PME/Pi у тканині РШ дорівнює 1,40 (0,8—5,32), тоді як у слизовій оболонці — 2,4 (1,58—3,83) ($p < 0,05$) (рис.2). Якщо порівнювати медіани різних метаболічних ³¹P МР-співвідношень у пухлинній тканині з такими в оточуючій її "нормальній" слизовій оболонці шлунка, які наведені в табл. 2, видно, що в пухлинній тканині вони значно відрізняються (від 1,4 до 2,4 разів). Таким чином, межа роз-

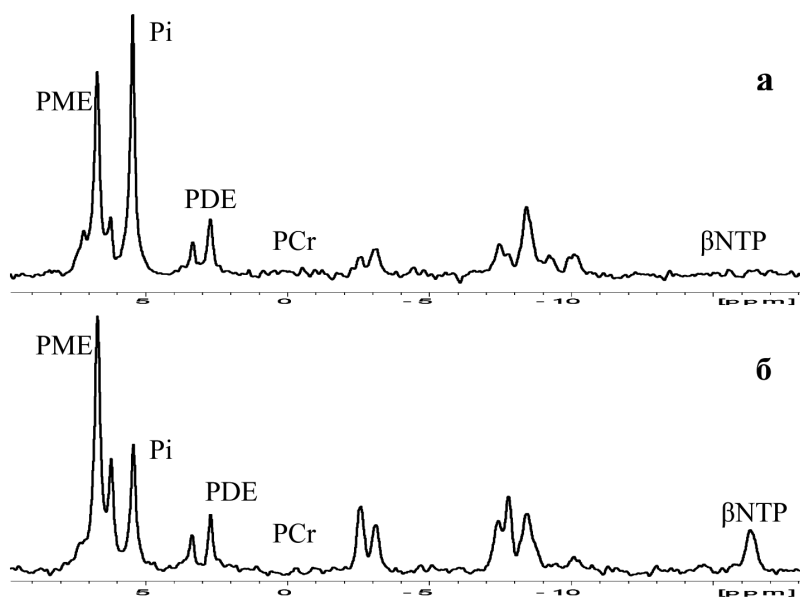


Рис. 1. ³¹P МР-спектри ПХЕ тканини РШ (а) та слизової оболонки (б)

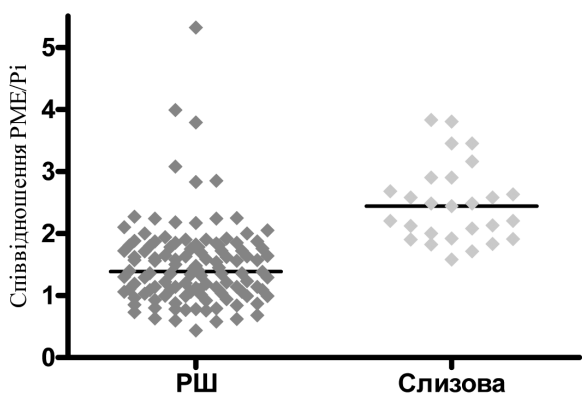


Рис. 2. Співвідношення PME/Pi в тканині РШ та слизовій оболонці шлунка, яка її оточує (наведені індивідуальні значення та медіана)

Таблиця 2

Метаболічні співвідношення у тканині РШ та слизовій оболонці шлунка, яка оточує пухлину

Тканина — Співвідношення	Медіана	Розподіл
РШ — PME/Pi	1,4	0,8 — 5,32
Слизова м PME/Pi	2,4	1,58 — 3,8
РШ — Pi/βNTP	6,14	1,1 — 23,0
Слизова — Pi/βNTP	2,6	0,8 — 6,6
РШ — PME/ βNTP	7,4	1,21 — 20,4
Слизова — PME/ βNTP	5,2	1,6 — 9,5

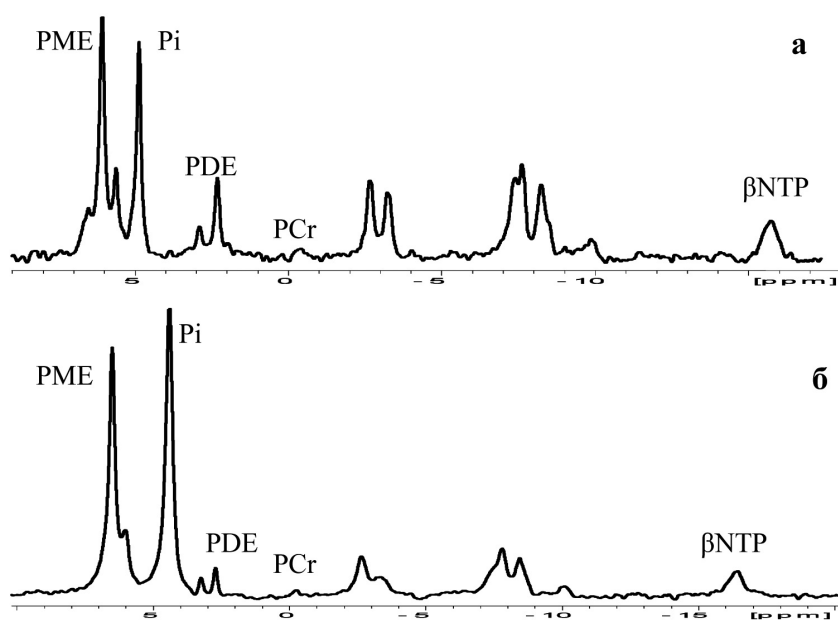


Рис. 3. ³¹P МР-спектри тканини РШ та раку шийки матки (хвора К. на РШ (а) та хвора В. на РШМ (б))

поділу між "задовільно" та "погано" оксигенованими пухлинами становить 1,4 для всіх обстежених хворих, що відповідає медіані співвідношення. Можна вважати, що пухлини, в яких $PME/Pi < 1,4$, є гіпоксичними, тоді як пухлини, в яких $PME/Pi > 1,4$ — задовільно оксигенованими. Встановлено при цьому, що "гіпоксичний" РШ складає 44%, а "оксигенований" — 56% випадків.

Для того щоб пересвідчитися, що співвідношення PME/Pi дійсно відображає рівень оксигенації в тканині РШ, був проведений порівняльний аналіз спектрів пухлинних тканин хворих на РШ та хворих на РШМ. Остання тканина, як добре відомо з робіт, в яких використана мікроелектродна техніка [17], є пухлиною, що знаходиться в стані глибокої гіпоксії. На відміну від ³¹P МР-спектрів РШ на спектрах тканини РШМ характерним є більш сильний сигнал Pi, не такий виразний сигнал PME і майже відсутні сигнали PDEs (рис. 3). При аналізі ³¹P МР спектрів було виявлено, що медіана співвідношення PME/Pi для тканини РШМ досить низька — 0,84, навіть менша за одиницю, а індивідуальні значення за даними розкиду не перевищують 1,0 (0,51 — 1,0), що підтверджує дані про високий рівень гіпоксії в тканині РШМ [2].

При детальному аналізі отриманих даних було виявлено три умовні групи хворих на РШ щодо рівня гіпоксії у пухлині за співвідношенням PME/Pi : $PME/Pi < 1,0$; $1,0 < PME/Pi < 2,0$ та $PME/Pi > 2,0$, що в процентному співвідношенні склало 29, 58 та 13% хворих відповідно. При співставленні рівнів гіпоксії в РШ, оцінених за допомогою співвідношення PME/Pi , з перебігом захворювання виявили, що у хворих, в пухлинах яких $PME/Pi < 1,0$, тобто новоутворення характеризувались "глибокою" гіпоксією, відзначали особливо несприятливий перебіг захворювання. В цій групі вмирав кожен другий хворий, тоді як в групі з показником $1,0 < PME/Pi < 2,0$ — вмирав кожен з трьох. За умов, коли PME/Pi в пухлині більше за 2,0, тобто коли пухлини характеризуються як задовільно оксигеновані, вмирили два хворих з п'яти. Це дозволяє припустити, що при задовільній оксигенації, яка загалом нехарактерна для переважної більшості злоякісних пухлин, новоутворення знаходяться у вельми сприятливих для свого розвитку умовах.

Слід зазначити, що кореляція між рівнем гіпоксії РШ та категоріями T і M (система TNM) і стадіями процесу не спостерігалася. Це збігається з відомим положенням, що рівень гіпоксії пухлини не залежить від розміру новоутворення, гістологічної форми, ступеня диференціювання, обсягу некротичних ділянок, клінічної стадії, і тому він може розглядатися як незалежний фактор прогнозу перебігу захво-

рювання [39]. В той же час встановлено важливий взаємозв'язок між високим рівнем гіпоксії у первинній пухлині та наявністю метастазів у лімфатичних вузлах хворих на РШ. У хворих, які не мають метастазів у лімфатичних вузлах (категорія N0), але спостерігається глибока гіпоксія в первинній пухлині ($PME/Pi < 1,0$), ризик несприятливого перебігу захворювання зростає більше ніж вдвічі ($hazard\ ratio = 2,1$, $CI\ 95\% = 0,67-4,67$; $p=0,035$).

Аналізуючи виживаність хворих на РШ залежно від співвідношення PME/Pi у пухлині (рис. 4), було встановлено, що тривалість життя хворих, в пухлинах яких $PME/Pi < 1,4$ (висока гіпоксія), коротша, ніж у групі хворих, в пухлинах яких $PME/Pi > 1,4$. Слід зазначити також, що у 88% хворих на РШ, які померли, значення PME/Pi у первинній пухлині було $< 1,4$.

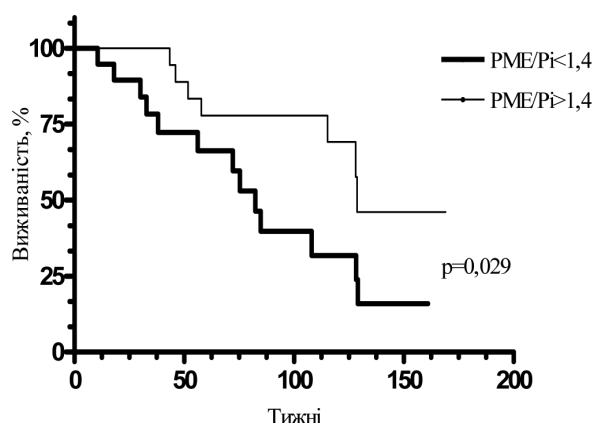


Рис. 4. Криві загальної виживаності хворих на РШ відповідно до рівня гіпоксії в пухлині (оцінка за Капланом — Майєром, \log -rank тест, $\chi^2=4,79$, $p=0,029$)

Визначення рівня фосфоліпідів у тканині

Визначення вмісту фосфоліпідів в екстрактах біологічних зразків звичними методами вимагають значних витрат часу та є трудомістким. МРС *in vitro* відкриває нові шляхи до визначення біохімічних змін, які відбуваються в пухлинах, зокрема на рівні фосфоліпідного та ліпідного метаболізму. Це дуже важливо, тому що фосфоровмісні сполуки, які залучені в процеси, тісно пов'язані з клітинною проліферацією, злоякісною трансформацією, агресивністю, метастазуванням, загибеллю клітин та їх чутливістю до хіміотерапії.

Так, роботи по МРС *in vitro* та *in vivo* показали більш високі концентрації як фосфомонофосфатів, так і фосфодіфосфатів у пухлинних клітинах порівняно з нормальними. Більш того, рівні PME і PDE зростають впродовж росту пухлини та її прогресії [18]. Це пояснюється тим, що злоякісні тканини характеризуються підвищеним попитом на фосфоліпідні метаболіти, зокрема фосфохолін та фосфоетаноламін, і припускається, що підвищений вміст фосфоліпідів обумовлений високим рівнем їх інкорпорації у клітинні мембрани. Збільшення внутрішньоклітинного пула PME асоціюється з посиленням синтезу клітинних мембран, ростом клітин і станом

клітинного живлення, хоча в останні роки доведено, що як зміни в сигнальних шляхах, так і навіть знижений рівень оксигенації в пухлинній тканині також роблять свій внесок у підвищений рівень фосфомонофосфатів [27].

Важливими показниками фосфоліпідного метаболізму є співвідношення PME/PDE , PE/PC та PC/GPC , які відображають обмін фосфоліпідів клітинних мембран. Співвідношення PME/PDE є складний показник, адже до його складу входять чотири фосфоровмісні сполуки: фосфохолін (PC) і фосфоетаноламін (PE) з одного боку, та гліцерофосфохолін (GPC) і гліцерофосфоетаноламін (GPE) — з іншого (рис.1). Перші два надають інформацію про синтез фосфоліпідів клітинної мембрани, останні два — про продукти їх деградації. Визнано, що співвідношення PME/PDE дає уявлення про відносну швидкість синтезу компонентів мембрани, яка постійно змінюється, та взагалі про їх метаболізм. Слід зазначити, що співвідношення PC/GPC за своєю біохімічною природою дуже близьке до співвідношення PME/PDE . Співвідношення PE/PC розглядають як індикатор стану клітинного росту та проліферації, тоді як PC/GPC — як індикатор злоякісності, що корелює з пухлинною прогресією [27]. Аналіз великої кількості клінічного матеріалу, отриманого за допомогою ^{31}P МРС, дозволив прийти до висновку, що найбільш частими рисами спектрів пухлин людини (остеосаркома, саркома м'яких тканин, лімфома, пухлини голови та шиї, рак грудної залози, первинний і метастатичний рак печінки, лімфоми печінки і селезінки, аденокарцинома передміхурової залози, за виключенням пухлин мозку) є високі сигнали PME і PDE.

Значне зниження рівня PME в пухлинах спостерігали у відповідь на терапію як в експерименті, так і в клініці [24]. Це спостереження визначили інтерес до дослідження наявності та модуляції сигналів PME і PDE на ^{31}P МРС-спектрах різних пухлин людини та оцінки значення їх як можливих індикаторів злоякісності і відповіді пухлини на терапевтичний вплив [26]. Було встановлено, що рівень фосфохоліну може слугувати метаболічним маркером прогресії раку грудної залози людини [29].

Важливо, що зниження інтенсивності PME-сигналу або співвідношення PME/PDE , яке спостерігається вже на ранніх термінах лікування, є надійним показником відповіді пухлини на променево- або хіміотерапію. Було також показано, що підвищення співвідношення PME/PDE відтворює репараційні процеси у мембрані, що мають місце в пухлинних клітинах у період їх відновлення після цитостатичного впливу [7]. Крім того, отримані дані, які вказали на прямий зв'язок між величиною співвідношення PME/PDE і метастазуванням у хворих на саркоми м'яких тканин та рак грудної залози. Важливим при цьому є те, що спостерігається прогностична значущість співвідношення PME/PDE [14].

У нашому дослідженні за метаболічними співвідношеннями усі пухлини умовно поділялися на такі, що мають або низький рівень певного фосфоліпідів, або високий, тобто менше або більше значення медіани. Медіани співвідношень показників

Таблиця 3

Метаболічні показники фосфоліпідного метаболізму ³¹P МР-спектроскопії в тканині РШ та слизовій оболонці

Тканина — Співвідношення	Медіана	Розподіл
РШ — PME/PDE	8,25	2,23 — 19,5
Слизова — PME/PDE	4,85	1,84 — 9,87
РШ — PE/PC	3,71	1,87 — 8,62
Слизова — PE/PC	2,4	1,49 — 3,47
РШ — PC/GPC	2,69	0,64 — 8,24
Слизова — PC/GPC	1,2	0,64 — 3,05

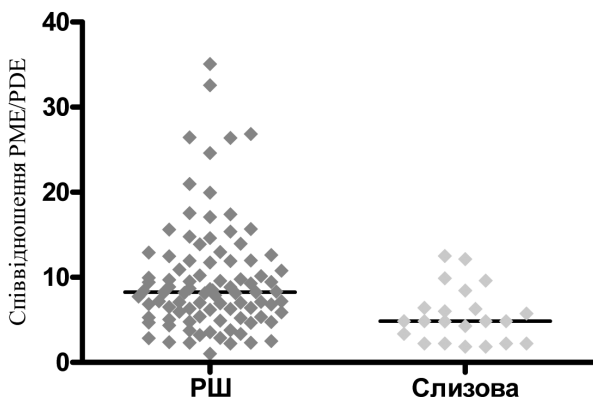


Рис. 5. Співвідношення PME/PDE в тканині РШ та слизовій оболонці шлунка, яка її оточує (індивідуальні значення та медіана)

фосфоліпідного метаболізму для РШ та їх розкид надані в табл. 3. На прикладі PME/PDE чітко видно, що є значна різниця в рівнях фосфоліпідів у пухлині порівняно зі слизовою оболонкою (рис.5).

Слід зазначити, що між цими всіма метаболічними співвідношеннями був виявлений тісний кореляційний зв'язок:

PME/PDE і PE/PC ($r=0,64$, $p=0,0032$); PME/PDE і PC/GPC ($r=0,83$, $p=0,0001$).

Встановлено також, що рівень фосфохолінвісних сполук у РШ пов'язаний з рівнем гіпоксії в пухлині: PME/PDE і PME/Pi та Pi/ β NTP ($r=0,0,29$, $p=0,047$ та $r=0,38$, $p=0,030$) відповідно, PE/PC і PME/Pi та з PME/ β NTPi ($r=0,36$, $p=0,0346$ та $r=0,39$, $p=0,019$) відповідно; PC/GPC і Pi/ β NTP та з PME/ β NTPi ($r=0,45$, $p=0,015$ та $r=0,459$, $p=0,018$) відповідно.

Крім того, було виявлено тісний взаємозв'язок між співвідношеннями PME/PDE і PE/PC, роз-

поділеними за рівнем гіпоксії в пухлині, з виживаністю хворих ($\chi^2=4,26$, $p<0,05$ та $\chi^2=3,86$, $p<0,05$ відповідно).

Показано, що коли в первинній пухлині спостерігається високий рівень гіпоксії (PME/Pi $<1,4$) і високе співвідношення (PE/PC $>3,71$), ризик смертності суттєво зростає (HR=4,7, CI 95% = 1,05—6,95; $p=0,0437$). Крім того, був також встановлений важливий взаємозв'язок між високим рівнем гіпоксії і високим значенням PE/PC $> 3,71$ у первинній пухлині та наявністю метастазів у лімфатичних вузлах хворих. У хворих з наявністю гіпоксії у пухлині (PME/Pi $<1,4$) та високим співвідношенням PE/PC $> 3,71$, але в яких відсутні метастази в лімфатичних вузлах (категорія N0), має місце несприятливий перебіг захворювання і загроза смерті зростає більш ніж удвічі (HR=2,8, CI 95% = 0,96—4,34; $p=0,0389$) порівняно з тими, в пухлинах яких PE/PC $< 3,71$.

Аналізуючи виживаність хворих на РШ щодо співвідношень PME/PDE та PE/PC, було виявлено, що тривалість життя хворих, в пухлинах яких значення цих співвідношень високі, тобто вищі за медіану, значно коротша, ніж хворих, у пухлинах яких ці значення низькі (рис. 6,7).

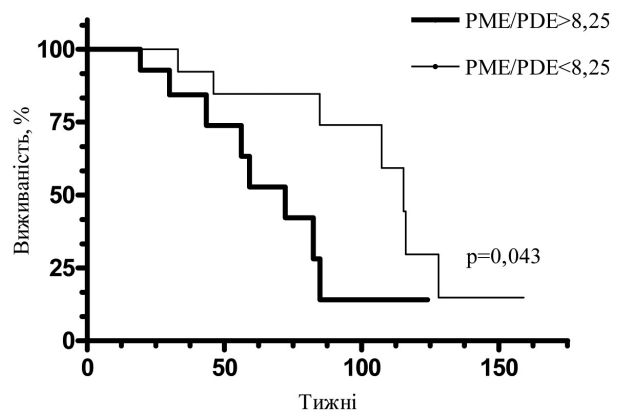


Рис. 6. Криві загальної виживаності хворих на РШ відповідно до співвідношення PME/PDE у пухлині (оцінка за Капланом — Майером, log-rank тест, $\chi^2=4,08$, $p=0,043$)

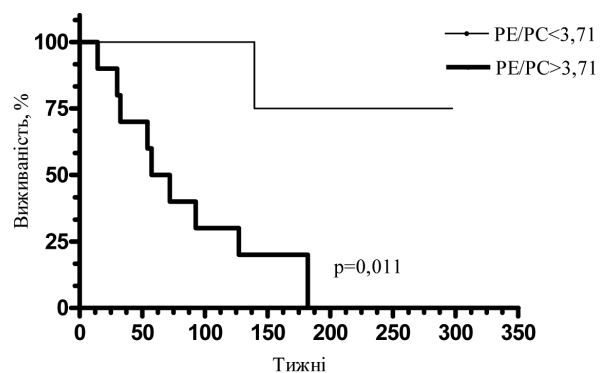


Рис. 7. Криві загальної виживаності хворих на РШ відповідно до співвідношення PE/PC у пухлині (оцінка за Капланом — Майером, log-rank тест, $\chi^2=6,45$, $p=0,011$)

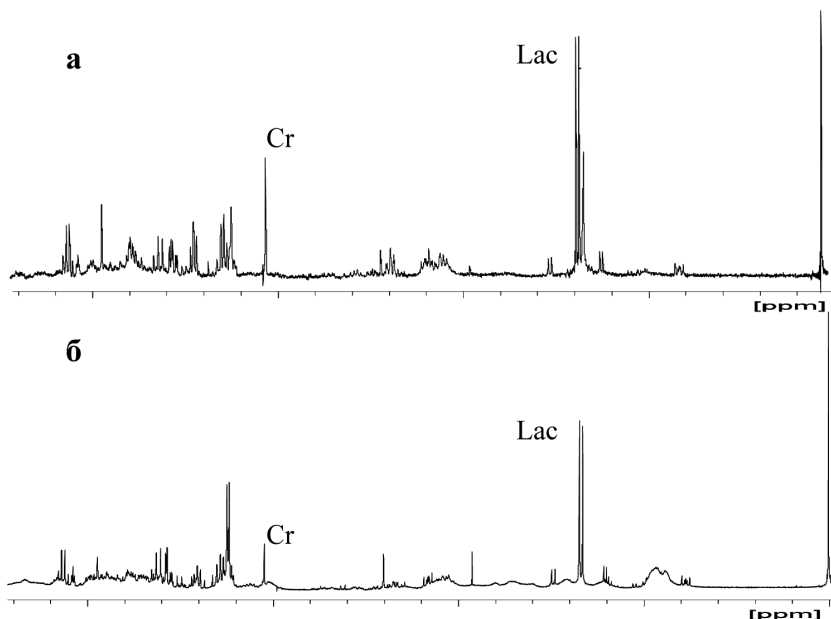


Рис. 8. ¹H МР-спектри тканини РШ (а) та слизової оболонки шлунка (б)

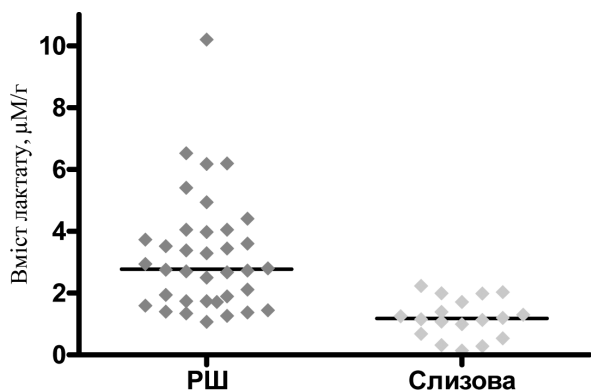


Рис. 9. Вміст лактату (µМ/г) в тканині РШ та слизовій оболонці шлунка, яка її оточує (вміст лактату згідно з ¹H МР-спектрів; індивідуальні значення та медіана)

Отримані дані вказують на те, що метаболічні співвідношення PME/PDE і PE/PC в первинному РШ можуть слугувати як фактори прогнозу перебігу захворювання та надавати додаткову інформацію, яка може бути корисною при первинному діагнозі РШ з використанням МРТ з МРС *in vivo*.

¹H МРС. Визнання лактату як маркера агресивності пухлини є результатом багаторічних досліджень, які остаточно встановили, що посилений аеробний гліколіз у пухлині є феноменом, притаманним злоякісним новоутворенням. Показано, що в первинних пухлинах шийки матки [36], голови та шиї [10], колоректальних карциномах [37], РШ [3] різко зростає вміст лактату. Збільшене накопичення лактату спричиняє зниження позаклітинного рН, що зменшує адгезивні властивості пухлинних клітин у межах злоякісної тканини і, таким чином, посилює їх розповсюдження у віддалені органи.

Встановлено, що високий вміст лактату корелює з більшою частотою утворення віддалених метастазів і невисокими показниками виживаності хворих вже на ранніх стадіях пухлинного процесу [35]. Висловлено припущення, що вміст лактату у первинній пухлині може бути основою нової метаболічної класифікації пухлин, яка буде сприяти підвищенню ефективності лікування онкологічних хворих [35]. Одним з підходів до реалізації цієї ідеї є використання методу МРС *in vivo* під час МРТ.

Типові ¹H МР-спектри ПХЕ тканини РШ представлені на рис.8. Медіана вмісту лактату, обчисленого за даними ¹H МРС в тканині РШ, дорівнювала 2,57 µМ/г тканини (0,2—10,5 µМ/г), тоді як в слизовій оболонці — 1,35 µМ/г (0,14—5,55 µМ/г) (рис. 9). Аналіз рівня лактату в зразках РШ був також здійснений з використанням співвідношення Lac/Cr, яке є загально-

визнаним у МРС і значно спрощує процедуру щодо визначення вмісту лактату в тканині. Креатин, як відомо, відноситься до енергетичної складової метаболізму клітини, яка в будь-яких умовах намагається підтримувати пул креатину на відносно постійному рівні. Тому метаболічне співвідношення Lac/Cr є більш стабільним показником, який співвідноситься із загальним метаболічним станом клітини. Медіана співвідношення Lac/Cr для тканини РШ дорівнювала 4,6 (1,4—32,5), тоді як для слизової оболонки — 1,5 (0,6—4,4), що представлено на рис.10. Щодо медіани цього співвідношення, то усі пухлини були умовно розподілені відносно медіани на такі, що мають низький рівень лактату — Lac/Cr < 4,6 або високий — Lac/Cr > 4,6. Як видно з розкиду, рівні лактату в тканині РШ дуже варіюють: вміст лактату в пухлині може бути або відносно низьким, або виключно високим. У середньому рівень лактату в пухлинній тканині згідно зі значеннями співвідношення Lac/Cr приблизно втричі вищий (p=0,039) порівняно з таким у "нормальній" слизовій оболонці шлунка.

Проведений аналіз значень метаболічного показника Lac/Cr з основними клініко-патологічними характеристиками РШ не виявив кореляції ані з гістологічним типом, ані зі ступенем диференціювання пухлини, але спостерігалася статистично достовірна кореляція (p=0,0423) зі стадією розвитку процесу. Крім того, співвідношення Lac/Cr у пухлинах хворих з категорією рT₃ і рT₄ було більшим (в 1,4 рази; p=0,785) порівняно з таким у хворих з категорією рT₁ і рT₂. Слід зазначити, що у хворих на РШ з категорією рT₄ не спостерігалася суттєвого збільшення вмісту лактату у пухлині порівняно з такими з рT₃. Це спостереження, яке збігається з літературними даними, пояснюється тим, що у великих пухлинах зони некрозу значно

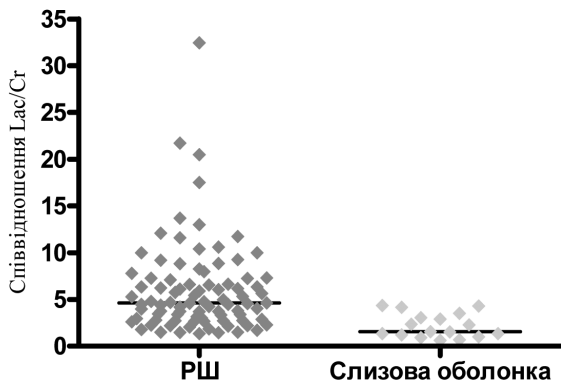


Рис. 10. Співвідношення Lac/Cr у тканині РШ та слизовій оболонці шлунка, яка її оточує (індивідуальні значення та медіана)

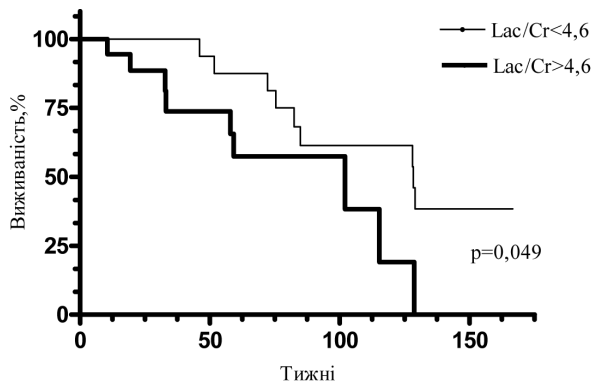


Рис. 11. Криві загальної виживаності хворих на РШ відповідно до рівня лактату, оціненого співвідношенням Lac/Cr, в пухлині (оцінка за Капланом — Майєром, log-rank тест, $\chi^2=3,876$, $p=0,049$)

більші, тоді як лактат продукується життєздатними клітинами, які знаходяться у добре перфузованих ділянках пухлини [12]. Виходячи з цього, стає зрозумілим, чому вміст лактату в первинній пухлині корелює зі злоякісною прогресією тільки на ранніх стадіях процесу [35]. Ці положення для тканини РШ, отримані за допомогою ^1H МРС, збіглися з даними, отриманими нами за допомогою ферментативного методу [3].

Аналізуючи виживаність хворих на РШ щодо співвідношення Lac/Cr, тобто щодо рівня лактату в тканині РШ, виявилось, що при низькому рівні лактату в пухлині (менше медіани) спостерігається достовірно більш довга тривалість життя, ніж за умов, коли рівень лактату в пухлині був високим (вище медіани) ($\chi^2=3,876$, $p=0,049$) (рис. 11).

Несприятливий перебіг захворювання пацієнтів з пухлинами з високим вмістом лактату може бути пов'язаний з високим рівнем внутрішньопухлинної гіпоксії, яка, як відомо, є однією з основних характеристик особливостей злоякісної пухлини [14]. Аналіз отриманих даних показав, що спостерігається статистично достовірний зворотний ко-

реляційний зв'язок ($p=0,0487$) між рівнями гіпоксії і лактату у тканині РШ за умов, коли пухлинна тканина є гіпоксичною. При цьому слід відмітити важливе спостереження, яке підкреслює складність взаємозв'язків між гіпоксією та гліколізом. Встановлено, що за умов, сприятливих для перебігу захворювання щодо рівня гіпоксії, а саме, коли тканина РШ задовільно окисенована ($\text{PME}/\text{Pi} > 1,4$), але в пухлині спостерігається високий вміст лактату ($\text{Lac}/\text{Cr} > 4,6$), ризик несприятливого перебігу захворювання зростає майже вдвічі ($\text{HR}=1,76$; $\text{CI } 95\%=0,65-2,87$; $p=0,0446$).

Отримані дані вказують на те, що співвідношення Lac/Cr є достовірним показником рівня лактату в тканині РШ, який може слугувати за фактор прогнозу перебігу захворювання та виживаності хворих.

Висновки

Метаболічне співвідношення PME/Pi дійсно відображає рівень оксигенації тканин, зокрема пухлинних. РШ людини за станом оксигенації може бути розподілено на три групи: $\text{PME}/\text{Pi} < 1,0$ (глибока гіпоксія); $1,0 < \text{PME}/\text{Pi} < 2,0$ (помірна гіпоксія) та $\text{PME}/\text{Pi} > 2,0$ (задовільна оксигенація), що в процентному співвідношенні склало 29, 58 та 13% хворих відповідно.

Встановлено важливий взаємозв'язок між високим рівнем гіпоксії у первинній пухлині та наявністю метастазів у лімфатичних вузлах хворих на РШ. У хворих, які не мають метастазів у лімфатичних вузлах (категорія N0), але спостерігається глибока гіпоксія в первинній пухлині ($\text{PME}/\text{Pi} < 1,0$), має місце негативний перебіг захворювання ($\text{HR}=2,1$; $\text{CI } 95\% = 0,67-4,67$; $p=0,035$).

Виявлено тісний взаємозв'язок між рівнем гіпоксії в пухлині, співвідношеннями PME/PDE і PE/PC та виживаністю хворих на РШ ($\chi^2=4,26$, $p < 0,05$ та $\chi^2=3,86$, $p < 0,05$) відповідно.

Встановлено, що за умов, відносно сприятливих для перебігу захворювання щодо рівня гіпоксії, а саме, $\text{PME}/\text{Pi} > 1,4$, але пухлина характеризується високим вмістом лактату ($\text{Lac}/\text{Cr} > 4,6$), ризик несприятливого перебігу захворювання зростає майже вдвічі ($\text{HR}=1,76$; $\text{CI } 95\%=0,65-2,87$; $p=0,0446$).

Поєднання МРТ з МРС може бути використано в передопераційний період та дозволить отримати вищенаведені метаболічні співвідношення у пухлині, повинно суттєво вплинути на підвищення інформативності діагностики злоякісних новоутворень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bubnovskaya L., Mikhailenko V., Kovelskaya A., Osinsky S. Bioenergetic status and hypoxia in Lewis lung carcinoma assessed by ^31P NMR spectroscopy: correlation with tumor progression // *Exp Oncol.* — 2007. — V.29, №3. — P. 207 — 211.
2. Бубновська Л.М., Ковельська А.В., Болдескул І.Є. та співавт. Рівень гіпоксії у тканині раку шлунка та перебіг захворювання // *Онкологія.* — 2009. — Т.11, № 1. — С. 39 — 44.
3. Ковельська А.В., Меренцев С.П., Болдескул І.Є., Бубновська Л.М. Рівень лактату та ^1H ЯМР метаболічне співвідношення лактат/креатин у тканині раку шлунка людини і прогноз перебігу захворювання // *Онкологія.* — 2009. — Т.11, № 2. — С. 104 — 108.

4. Осинский С.П., Ваупель П. Микрофизиология опухолей. — К.: Наукова думка, 2009. — 256 с.
5. Осинский С.П., Глузман Д.Ф., Клифф Й., Гизе Н.А., Фрисс Г. Молекулярная диагностика опухолей. — К.: 2007. — 246 с.
6. Рогожин В.О., Рожкова З.З. ЯМР-спектроскопія in vivo: додаткові можливості МР-томографії при дослідженні головного мозку // Український радіологічний журнал. — 2002. — Т. 10. — С. 409 — 417.
7. Ackerstaff E., Glunde K., Bhujwalla Z.M. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? // J Cell Biochem. — 2003. — V. 90. — P. 525 — 33.
8. Airley R.E., Loncaster J., Raleigh J.A., et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding // Int J Cancer. — 2003. — V. 104. — P. 85 — 91.
9. Baek H-M., Chen J-H., Nalcioğlu O., Su M-Y. Proton MR spectroscopy for monitoring early treatment response of breast cancer to neo-adjuvant chemotherapy // Ann Oncol. — 2008. — V. 19. — P. 1022 — 1024.
10. Brizel D.M., Schroeder T., Scher R.L. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer // Int J Radiat Oncol Biol Phys. — 2001. — V. 51. — P. 349 — 353.
11. Bussink J., Kaanders J.H.A.M., van der Kogel A.J. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers // Radiother Oncol. — 2003. — V. 67. — P. 3 — 15.
12. Carcia-Martin M-L., Herigault G., Remy C. et al. Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by ¹H Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging: comparison with maps of metabolites // Cancer Res. — 2001. — V. 61. — P. 6524 — 6531.
13. Cheng L.L., Burns M.A. Taylor J.L. et al. Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy // Cancer Res. — 2005. — V. 65. — P. 3030 — 3034.
14. Dewhirst M.W., Poulson J.M., Yu D. et al. Relation between pO₂, ³¹P 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. — V. 61. — P. 480 — 91.
15. Evans S.M., Koch C.J. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans // Cancer Lett. — 2003. — V. 195. — P. 1 — 16.
16. 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. — V. 65. — P. 7041 — 7044.
17. 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. — V. 56. — P. 4509 — 4515.
18. Kuliszkiewicz-Janus M., Janus W., Baczynski S. Application of ³¹P NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipids in Leukemia, Lymphoma and some other Non-Haematological cancers // Anticancer Res. — 1996. — V. 16. — P. 1587 — 1594.
19. Leach M.O. Introduction to in vivo MRS of cancer: new perspectives and open problems // Anticancer Res. — 1996. — V. 16. — P. 1503 — 1514.
20. Le Q-T., Kong C., Lavori P.W. 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. — V. 69. — P. 167 — 175.
21. Loncaster J.A., Harris A.L., Davidson S.E. 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. — V. 61. — P. 6394 — 6399.
22. Knopp M.V., Tengg-Kobligh von H, Choyke. Functional magnetic resonance imaging in oncology for diagnosis and therapy monitoring // Mol Cancer Therapeutics. — 2003. — V. 2. — P. 419 — 426.
23. Mayer A., Hockel M., Vaupel P. Endogenous hypoxia markers: case not proven! // Adv. Exp. Med. Biol. — 2008. — V. 614. — P. 127 — 136.
24. Negendank W.G. Studies of human tumors by MRS: a review // NMR Biomed. — 1992. — V. 5. — P. 303 — 24.
25. Niederhuber J.E. ACTNOW opens the gate for timely, novel research // NCI Cancer Bulletin. — 2009. — V. 6, N16. — P. Director's Update.
26. Podo F., de Certaines J.D. Magnetic resonance spectroscopy in cancer: phospholipid, neutral lipid and lipoprotein metabolism and function // Anticancer Res. — 1996. — V. 16. — P. 1305 — 1316.
27. Podo F. Tumor phospholipid metabolism // NMR in Biomed. — 1999. — V. 12. — P. 413 — 439.
28. Rofstad E.K., De Muth D., Fenton B.M., Sutherland R.M. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy studies of tumor energy metabolism and its relationship to intracapillary oxyhemoglobin saturation status and tumor hypoxia // Cancer Res. — 1988. — V. 48. — P. 5440 — 5446.
29. Singer S., Souza K., Thilly W.G. Pyruvate utilization, phosphocholine and adenosine triphosphate (ATP) are markers of human breast tumor progression: a ³¹P- and ¹³C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy study // Cancer Res. — 1995. — V. 55. — P. 5140 — 5145.
30. Tatum J.L., Kelloff G.J., Gillies R.J. et al. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy // International Journal of Radiation Biology. — 2006. — V. 82, N° 10. — P. 699 — 757.
31. Vaupel P. Strikingly high respiratory quotients: a further characteristic of the tumor pathophysiology // Adv. Exp. Med. Biol. — 2008. — V. 614. — P. 121 — 125.
32. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome // Cancer Metastasis Rev. — 2007. — V. 26, N° 2. — P. 225 — 239.
33. Vaupel P., Okunieff P., Neuringer L. In vivo, ³¹P-NMR spectroscopy of murine tumours before and after localized hyperthermia // Int. J. Hyperthermia. — 1990. — V. 6. — P. 15 — 31.
34. Vaupel P., Okunieff P., Kallinowski F., Neuringer L.J. Correlation between ³¹P-NMR spectroscopy and tissue O₂ tension measurements in a murine fibrocarcoma // Radiation Res. — 1989. — V. 120. — P. 477 — 493.
35. Walenta S., Schroeder T., Mueller-Klieser W.F. Lactate in solid malignant tumors: potential of metabolic classification in clinical oncology // Curr Med Chem. — 2004. — V. 11. — P. 2195 — 2204.
36. Walenta S., Wetterling M., Lehrke M. et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers // Cancer Res. — 2000. — V. 60. — P. 916 — 921.
37. Walenta S., Chau T.V., Schroeder T. et al. Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: A novel guideline for clinical oncologists? // J Cancer Res Clin Oncol. — 2003. — V. 129. — P. 321 — 326.
38. Warburg O. The metabolism of tumors. — London: Constable, 1930.
39. Wouters B.G., Weppler S.A., Koritzinsky M., et al. Hypoxia as a target for combined modality treatments // Eur J Cancer. — 2002. — V. 38, N° 2 — P. 240 — 257.
40. Zakian K.L., Shukla-Dave A., Meyers P. et al. Identification of prognostic markers in bone sarcomas using proton-decoupled phosphorus magnetic resonance spectroscopy // Cancer Res. — 2003. — V. 63. — P. 9042 — 9047.

РЕЗЮМЕ. Цель работы: показать возможность оценки состояния оксигенации опухоли с помощью ³¹P МРС (соотношение PME/Pi) и определения уровня лактата ¹H МРС (соотношение Lac/Cr) и выяснить значение указанных показателей для прогноза течения заболевания.

Материал и методы. Обследовано 118 больных с диагнозом первичный рак желудка (РЖ), которым проводилось

только хирургическое вмешательство. Образцы опухолевой и слизистой ткани желудка получали во время операции. Уровни в ткани гипоксии, фосфолипидов и лактата определяли с помощью ^{31}P и ^1H МР-спектроскопии в перхлорных экстрактах.

Результаты. Установлено, что РЖ человека довольно хорошо оксигенированная опухоль, соотношение PME/Pi достоверно отражает уровень ее оксигенации. Наличие глубокой гипоксии в первичной опухоли, увеличение таких соотношений, как PME/PDE, PE/PC и Lac/Cr, указывает на неблагоприятный прогноз заболевания.

SUMMARY. The aim of study — to clarify the possibility to assess of oxygenation status of tumor by means of ^{31}P MR

spectroscopy (PME/Pi metabolic ratio) as well as to detect the lactate level by ^1H MR (Lac/Cr metabolic ratio) and evaluate of clinical relevance of above mentioned parameters for prognosis of clinical outcome.

Materials and methods. 118 patients with primary untreated gastric cancer were enrolled into study. Tumor and normal mucosa samples were obtained within operation. Level of hypoxia, phospholipides and lactate in tissues were detected by ^{31}P and ^1H MR spectroscopy in tissue perchloric extracts.

Results. It was determined that human gastric cancer is characterized by moderate oxygenation. PME/Pi ratio may reliably evaluate the level of tumor oxygenation. Strong hypoxia in primary tumor as well as increase of PME/PDE, PE/PC and Lac/Cr ratios indicate the unfavorable prognosis.

Реферативная информация

Бинарные каталитические системы как химио- и радиомодификаторы (экспериментальные исследования)

Р.М. Якубовская, А.А. Панкратов, О.А. Безбородова и др.

Российский биотерапевтический журнал. — 2009. — Т.8. — № 2. — С. 25 — 26.

Цель — изучение химио- и радиомодифицирующего действия бинарных каталитических систем (БКС) на основе препаратов "Оксикобаламин-лио" (Ок), "Терафтал-лио" (Тф) и "Эфитер".

Материалы и методы. Исследования проводили на мышах с перевиваемыми опухолями различного гистогенеза (лимфолейкоз Р-388 (Р-388), АМЖ Са-755, АКЭ, КЛЛ), варьируя дозы препаратов, режимы их применения и облучения (источник — кобальт-60).

Результаты. Свойства БКС изучены в отношении эффективности цисплатина, циклофосфана, доксорубицина, 5-фторурацила и интаксела. Установлено, что эти БКС повышают эффективность монотерапии химиопрепаратами в среднем на 60 %.

Максимальный терапевтический эффект у мышей с Р-388, Са-755 и АКЭ был отмечен при комбинированном применении исследуемых БКС и препарата цисплатин. У животных наблюдали повышение эффективности лечения по сравнению с монотерапией цисплатином на 40 — 110 %. В экспериментах удалось снизить дозу высокотоксичного цитостатика в 2 — 4 раза без снижения лечебного эффекта.

БКС на основе Ок, Тф и ЭТФ являются эффективными радиомодификаторами. Так, у мышей с АКЭ при тотальном облучении животных и при использовании в качестве радиомодификатора БКС "Ок+Ак" и "Тф+Ак" в 100 и 70 % случаев соответственно наблюдали полное излечение животных от опухоли. На опухолевой модели — LLC, которая является более резистентной к терапии БКС и лучевой терапии, исследуемые БКС приводили к повышению эффективности лечения на 25 %.

Комбинированное применение 3 методов лечения — бинарной каталитической терапии (БКС на основе Ок и ЭТФ), химиотерапии (препарат цисплатин) и лучевой терапии приводило к повышению эффективности лечения (по ингибированию роста опухоли) на 45 — 50 % по сравнению с эффективностью лечения только цисплатином или лучевой терапии.