

І.І. Ганусевич¹
Л.Д. Гуменюк¹
Д.С. Осинський²
А.В. Ковельська¹
Л.М. Бубновська¹
Л.А. Мамонтова¹
С.П. Осинський¹

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

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

Ключові слова: рак шлунка, матриксні металопротеїнази, гіпоксія, гіпоксіясоційовані показники, метастазування, виживаність.

ЗВ'ЯЗОК МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ-2 ТА -9 ІЗ РЕГІОНАРНИМ І ВІДДАЛЕНИМ МЕТАСТАЗУВАННЯМ РАКУ ШЛУНКА ЛЮДИНИ

Обґрунтування: серед білків, які активуються за умов гіпоксії, важливу роль у метастазуванні пухлини відіграють матриксні металопротеїнази (ММП), зокрема ММП-2 та -9, які здійснюють деградацію позаклітинного матриксу. **Мета:** визначення взаємозв'язку між рівнем активності ММП у пухлинній тканині раку шлунка (РШ), клініко-патологічними показниками та деякими асоційованими з гіпоксією характеристиками пухлини (співвідношення вмісту фосфомоноестери/неорганічний фосфат — РМЕ/Рі, фосфомоноестери/фосфодіестери — РМЕ/РДЕ, HIF-1 α , CD34), наявністю пухлинних клітин у регіонарних лімфатичних вузлах (РЛВ) та тривалістю життя хворих. **Методи:** імуногістохімічний, зимографія, ЯМР-спектроскопія, статистичний аналіз. **Результати:** за задовільної оксигенації пухлини (РМЕ/Рі > 2,0) характерні низькі показники сумарної активності ММП, при зростанні рівня гіпоксії (1,0 < РМЕ/Рі < 2,0) ці показники підвищуються в середньому в 4,5 рази. Сумарна активність ММП-2 і -9 корелює з експресією HIF-1 α у РШ ($r = 0,58$; $p < 0,05$). Виявлено пряму позитивну кореляцію між активністю ММП-9, з одного боку, та метаболічним показником РМЕ/РДЕ ($r = 0,44$; $p < 0,05$) і щільністю мікросудин ($r = 0,46$, $p < 0,05$), з іншого. Вміст активної ММП-2 зворотно корелює із категорією М. Не виявлено залежності між концентраціями активних ММП у пухлині та категорією N, але для хворих із цитокератинпозитивними (СК⁺) РЛВ характерні достовірно вищі (в 1,5 рази) значення активності ММП-2 у пухлині порівняно з пацієнтами із цитокератиннегативними (СК⁻) РЛВ. Хворі на РШ, у яких концентрація активної ММП-2 в пухлині < 2 мкг/г, а ММП-9 — < 4,5 мкг/г, живуть достовірно довше та мають нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж пацієнти з відповідно вищою концентрацією активних ММП у пухлині. **Висновок:** визначення активності ММП-2 та -9 у пухлині може бути використано для прогнозу раннього метастазування, зокрема в РЛВ, та в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ.

ВСТУП

Серед основних нозологічних форм злоякісних новоутворень рак шлунка (РШ) займає 2-ге місце у світі. Показники 2011 р. свідчать, що в Україні РШ у структурі захворюваності на злоякісні новоутворення посідає 4-те місце серед чоловіків і 7-ме — серед жінок, у структурі смертності від злоякісних новоутворень РШ займає 2-ге місце серед чоловічого і 3-тє — серед жіночого населення [1]. Відомо, що покращити ефективність терапії та показники виживаності хворих можливо завдяки прогнозу перебігу онкологічного захворювання та відповідної своєчасної корекції схеми лікування. Зокрема, при РШ використовують низку прогностичних факторів, серед яких найпоширенішими є показники системи TNM [2], а саме категорії N та M, а також наявність дисемінованих пухлинних клітин (ПК) у кістковому мозку хворих [3].

Однією з найбільш характерних ознак злоякісного новоутворення, що сприяє пухлинній прогресії, є гіпоксія [4]. Наразі в експериментальних дослідженнях та на клінічному матеріалі показано зв'язок між кількістю дисемінованих ПК у кістковому мозку та окремими гіпоксіязалежними показниками в пухлинній тканині (ПТ) [5, 6], але стосовно прогнозу перебігу РШ, який враховував би рівні гіпоксії та/або експресії/активності гіпоксіязалежних білків в пухлині, наукові дані є малочисельними та недостатньо підтвердженими.

Серед білків, які активуються за умов гіпоксії, важливу роль у пухлинній прогресії відіграють матриксні металопротеїнази-2 та -9 (ММП-2 та -9), або желатинази А і В відповідно [7–9], які є ферментами родини цинкзалежних ендопептидаз, синтезуються клітинами пухлини та прилеглої до неї тканини, ендотеліальними, імунокомпетентними клітинами та їх попередниками і здійснюють деградацію позаклітинного матриксу при метастазуванні пухлини [10, 11]. У сучасних дослідженнях пригнічення,

серед білків, які активуються за умов гіпоксії, важливу роль у пухлинній прогресії відіграють матриксні металопротеїнази-2 та -9 (ММП-2 та -9), або желатинази А і В відповідно [7–9], які є ферментами родини цинкзалежних ендопептидаз, синтезуються клітинами пухлини та прилеглої до неї тканини, ендотеліальними, імунокомпетентними клітинами та їх попередниками і здійснюють деградацію позаклітинного матриксу при метастазуванні пухлини [10, 11]. У сучасних дослідженнях пригнічення,

стабілізацію чи посилення деструкції позаклітинного матриксу вважають критичною характеристикою злоякісного прогресування [10] та пов'язують рівень експресії желатиназ із рівнем метастазування та загальною виживаністю хворих на рак [11], зокрема РШ [12–15]. Прогноз перебігу РШ шляхом визначення гіпоксіясоційованих показників у ПТ (і серед них рівня експресії/активності ММП-2 та -9) дасть можливість комплексної оцінки ступеня агресивності пухлини, дозволить контролювати ефективність протипухлинної терапії, коригувати схеми лікування та поліпшити показники виживаності хворих.

Раніше в наших дослідженнях на мишах із карциномою легені Льюїс було показано, що підвищення рівня пухлинної гіпоксії супроводжується збільшенням активності желатиназ у пухлині та посиленням метастазування [16]. Також результати наших експериментів *in vitro* демонструють, що формування клітинної гіпоксії за участю радикальних форм кисню призводить до активації ММП-2 та -9 в тканині РШ [17]. На підставі зазначених результатів і даних літератури нами розширено пошук можливостей використання желатиназ як гіпоксіясоційованих маркерів метастазування РШ.

Метою роботи є виявлення взаємозв'язку між рівнем активності желатиназ у пухлині, клініко-патологічними та деякими гіпоксіясоційованими показниками (PME/Pi, PME/PDE, HIF-1 α , CD34), наявністю ПК у лімфатичних вузлах (ЛВ) та тривалістю життя хворих на РШ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено зразки ПТ (післяопераційний матеріал) 112 хворих на первинний РШ, які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі МОЗ України з 2005 по 2011 р. Пацієнти не отримували передопераційної терапії. Хворі були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу з дослідницькою метою.

За гістологічною структурою більшість досліджуваних пухлин становить аденокарцинома (60%) та недиференційований рак (30%), за ступенем диференціації — G₃ (45%), за локалізацією — пухлини нижньої третини шлунка (50%). Обстежені пацієнти розподілилися майже рівномірно за II, III та IV стадіями захворювання (29; 30; 24% відповідно), дещо меншою є група хворих із I стадією (17%). Серед хворих переважають пацієнти з категоріями T3 (56%) та M0 (88%), за категоріями N0 та N1–2 розподіл рівномірний (48 та 52% відповідно).

Частину ПТ, отриманої під час оперативного втручання, одразу занурювали в забуферений формалін, після чого готували парафінові блоки за стандартною методикою. Парафінові блоки за допомогою мікротома нарізали на зрізи

товщиною 4–6 мкм, які наносили на предметне скло. Іншу частину ПТ, отриманої під час операції, зберігали в рідкому азоті при температурі –180 °C не більше 1 міс.

В отриманих зразках ПТ визначали концентрацію активних і латентних форм ММП-2 та -9 методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину-субстрата) на основі SDS-електрофорезу білків [18]. Після відмивання гелю активні форми ММП-2 та -9 візуалізувалися у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, локалізація яких відповідала молекулярній масі кожного із ферментів (72 та 92 кДа відповідно) і визначалася за стандартами молекулярної маси (Sigma, США). Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом обчислення площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і -9 (Sigma, США). Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

З метою визначення PME/Pi застосовували метод ЯМР-спектроскопії [19]. Зі зразка гомогенізованої ПТ екстрагували фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2 н HClO₄. Потім рН доводили до значень 7,6–8,0, дивалентні іони видаляли за допомогою Chelex 10 мг/5 мл (Sigma, США), фільтрували, ліофілізували та зберігали при температурі –20 °C. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹P ЯМР спектрометрі зразки розчиняли в 1,0 мл D₂O, центрифугували і переносили в ЯМР-пробірку для аналізу. Спектри ПХЕ реєстрували на ЯМР-спектрометрі (Bruker), використовуючи кювети 5 мм; вимірювали при 161,976 МГц зі спектральною шириною 64724,9 Гц, шириною імпульсу 90° та затримкою 4 с. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma, США) правила за стандарт. Усі ³¹P-хімічні зрушення у спектрах співвідносили до сигналу фосфокреатину, який позначали як 0,0 ppm. Визначали співвідношення PME/Pi та PME/PDE (фосфомоноестери/фосфодіестери).

Імуногістохімічне (ІГХ) виявлення експресії білка CD34 проводили з використанням відповідних MkAT (клас II, клон QVEnd, DakoCytomation, Данія) у розведенні 1:100 на депарафінізованих зрізах ПТ. Для виявлення експресії CD34 на зрізи наносили 1% розчин сироваткового альбуміну бика, потім проводили інкубацію препаратів із відповідними MkAT в оптимальному розведенні протягом 1 год. Після промивання препаратів у розчині фосфатного буфера їх інкубували 40 хв у полімерному розчині. Для візуалізації активності пероксидази використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлоридом (ДАБ) (DakoCytomation, Данія) та забарвлювали зрізи гематоксиліном Мейера. За допомогою світлового мікроскопа візуалізували клітини, що експресують CD34, як клітини, забарвлені коричневим кольором.

У тканині РШ тих самих хворих визначали експресію транскрипційного фактора HIF-1 α , використовуючи відповідні MkAT (H1alpha67, Abcam,

Англія). Як систему візуалізації використано ланцюговий метод із полімеразною кон'югацією EnVision/HRP (DakoCytomation, Данія) із субстрат-хромогеном ДАВ.

У тканині ЛВ ІГХ методом виявляли панцитокератинпозитивні клітини. Як первинне антитіло використовували антипанцитокератинові МкАТ (MNF116, DakoCytomation, Данія). Як систему візуалізації застосовано ланцюговий метод із полімеразною кон'югацією EnVision/HRP (DakoCytomation, Данія) із субстрат-хромогеном ДАВ. Виявлення в ЛВ хворих на РШ панцитокератинпозитивних (СК⁺) клітин було підставою для констатації наявності ПК, тобто метастатичного ураження.

Проводили статистичну обробку даних із використанням методів варіаційної статистики із застосуванням програм «Statistica 8.0» та «Prism 4.0». Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта кореляції Спірмена (*rho*). Виживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера, вірогідність розбіжностей між кривими виживаності визначали за допомогою log-rank-тесту. Статистичну значущість прийнято при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У пухлинах усіх обстежених визначали концентрації активних форм ММП-2 і -9. Активність ММП-2 коливалася в межах $0,1 \div 52,8$ мкг/г, середнє значення становило $8,2 \pm 4,9$ мкг/г тканини. Активність ММП-9 варіювали від 0,05 до 28,8 мкг/тканини, середнє значення — $8,3 \pm 5,9$ мкг/г. Про гіпоксія-регульований характер активації ММП-2 та -9 у пухлині свідчать встановлені позитивні залежності між рівнями активності желатиназ і низкою гіпоксіясоційованих показників у тканині РШ.

Як відомо, для оцінки біоенергетичного статусу тканини та рівня її гіпоксії визначали метаболічний показник РМЕ/Рі співвідношення (фосфомоноестери/неорганічний фосфат), що узагальнює прояви хронічної та гострої гіпоксії у тканині і характеризує рівень фосфорвмісних речовин, які задіяні в енергетичному обміні тканини. Визначено лінійну кореляцію ($p < 0,001$) між середнім значенням парціального тиску кисню (pO_2) та відповідним значенням цього співвідношення [19]. Результати дослідження рівня гіпоксії у тканині РШ свідчать про значні коливання індивідуальних значень співвідношення РМЕ/Рі від 0,8 до 5,32 при медіані 1,4. Виявлено також, що у «нормальній» слизовій оболонці шлунка співвідношення РМЕ/Рі майже в 2 рази вище порівняно з відповідним співвідношенням у тканині РШ, тобто «нормальна» тканина удвічі краще окисенована, ніж пухлинна. Встановлено, що при умовно прийнятій межі між «добре» та «бідно» окисенованими пухлинами, яка дорівнює

1,4, «гіпоксичний» РШ становить 44%, а «окисенований» — 56% випадків. При аналізі отриманих даних виявлено 3 умовні групи хворих на РШ за рівнем гіпоксії в пухлині: група хворих, у яких співвідношення РМЕ/Рі $< 1,0$, тобто пухлини з надто глибокою гіпоксією; $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$ — з помірним рівнем гіпоксії; $\text{РМЕ/Рі} > 2,0$ — задовільно окисеновані пухлини (29; 58 та 13% хворих відповідно). Рівень окисенації в останній групі співвідноситься з рівнем гіпоксії в «нормальних» тканинах.

Проаналізовано взаємозв'язок між рівнем гіпоксії та активністю ММП-2 і -9 у ПТ хворих на РШ. Виявлено залежність між показником РМЕ/Рі, що характеризує рівень окисенації пухлини, та сумарною желатиназною активністю (таблиця). При високій окисенації пухлини ($\text{РМЕ/Рі} > 2,0$) відзначають невисокі показники активності желатиназ, при збільшенні гіпоксії ($1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$) значення зростають у декілька разів, а в умовах глибокої гіпоксії ($\text{РМЕ/Рі} < 1,0$) мають тенденцію до зниження. Отримані дані свідчать про те, що контроль активності ММП-2 і -9 у пухлині асоційований із рівнем гіпоксії, та співвідносяться з результатами, одержаними нами раніше в модельних експериментах на мишах із карциномою легені Льюїс [16].

Таблиця
Співвідношення РМЕ/Рі та сумарна активність желатиназ у ПТ хворих на РШ

РМЕ/Рі	Активність желатиназ, мкг/г тканини
$> 2,0$	$5,1 \pm 3,9$
$1,0 \div 2,0$	$23,0 \pm 12,8^*$
$< 1,0$	$17,3 \pm 15,9$

Примітка: * $p < 0,05$.

Досліджені також кореляційні зв'язки між активністю желатиназ і метаболічним показником РМЕ/РДЕ, високі значення якого співвідносять із раннім метастазуванням пухлин. За нашими даними, між цим показником і ММП-9 існує пряма позитивна кореляція ($r = 0,45$; $p < 0,05$) (рис. 1). Зрозуміло є необхідність ширших досліджень, але завчасно можна передбачити, що ММП-9 відповідальна за раннє метастазування завдяки ключовій ролі, яка належить їй у неоангіогенезі. Так, із даних літератури відомо, що, беручи участь у неоангіогенезі, ММП-9 впливає на ефективність інтравазації. Показано на тваринних моделях, що експресія ММП-9 в деяких клітинних лініях корелює зі здатністю ПК до інтравазації. При цьому дія маримастату, який є інгібітором і ММП, і ангіогенезу одночасно, призводила до інгібіції інтравазації ПК [22].

У результаті визначення експресії HIF-1 α у тканині РШ виявлено значну варіабельність кількості HIF-1 α -позитивних клітин (HIF-1 α^+ клітин) від 5,1 до 71,5% з медіаною 26% (рис. 2). Лише у 7% хворих пухлини були диференційовані як HIF-1 α -негативні. Встановлено пряму позитивну кореляцію між кількістю HIF-1 α^+ -клітин і сумарною активністю ММП-2 та -9 ($r = 0,58$; $p < 0,05$) (рис. 3).

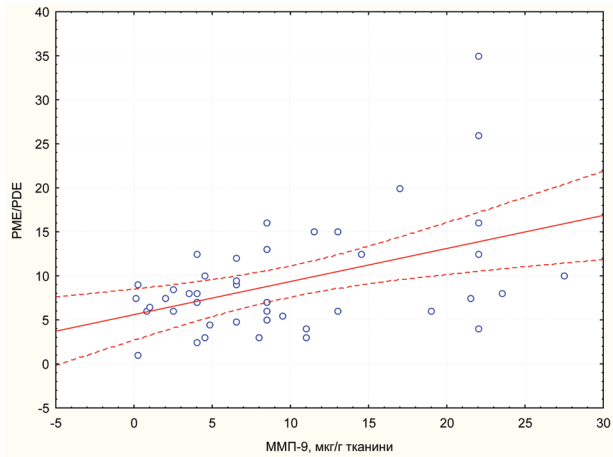


Рис. 1. Активність ММП-9 та співвідношення РМЕ/РДЕ в тканині РШ

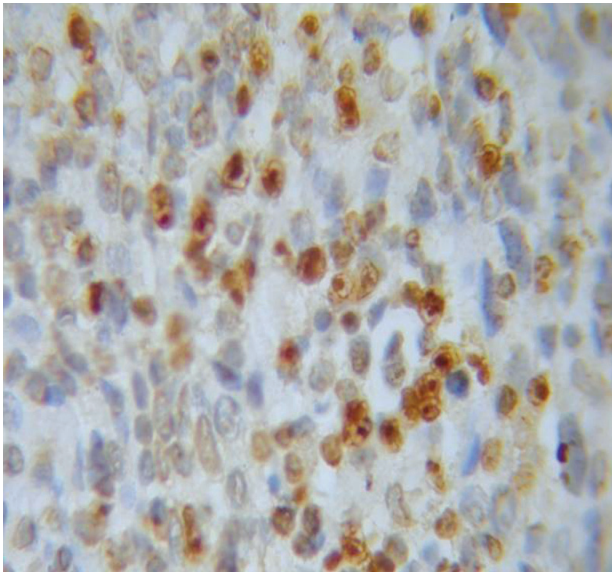


Рис. 2. HIF-1 α -позитивні клітини у тканині РШ ($\times 200$)

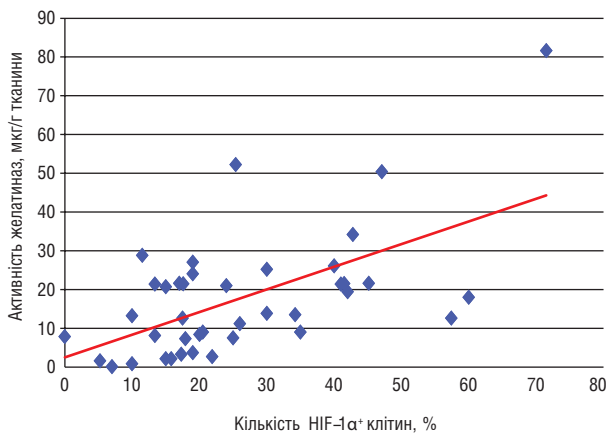


Рис. 3. Кількість HIF-1 α ⁺-клітин і сумарна активність желатиназ у тканині РШ

Визначено рівень експресії CD34, що є показником щільності мікросудин (ЩМС) у тканині РШ досліджуваних хворих (рис. 4). За результатами ІГХ реакції експресію CD34 реєстрували у всіх зразках ПТ. Виявлено, що ЩМС у пухлинах хворих на РШ не є однорідною і характеризується зна-

чною варіабельністю: від 64 до 367 мікросудин/мм² (медіана 136 мікросудин/мм²). Встановлено також пряму позитивну залежність ЩМС від активності ММП-9 в пухлині ($r = 0,46$; $p < 0,05$) (рис. 5), що підтверджує важливу роль цієї желатинази у неоваскуляризації [11].

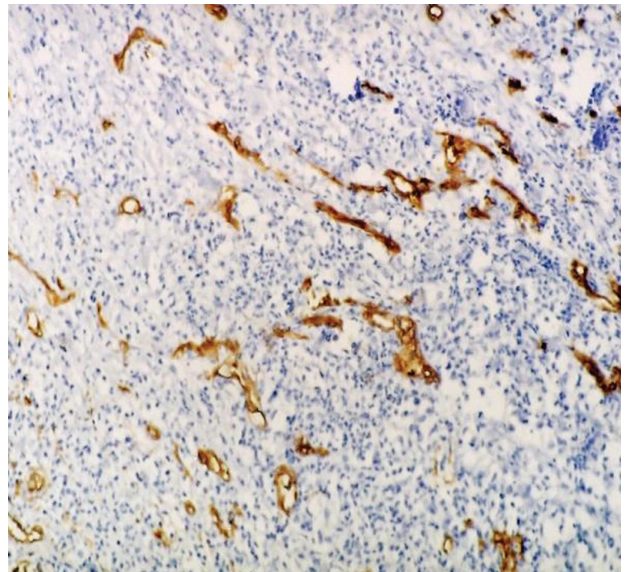


Рис. 4. Високий рівень експресії CD34 в тканині РШ, оцінений ІГХ методом, що вказує на активний неоангіогенез ($\times 160$)

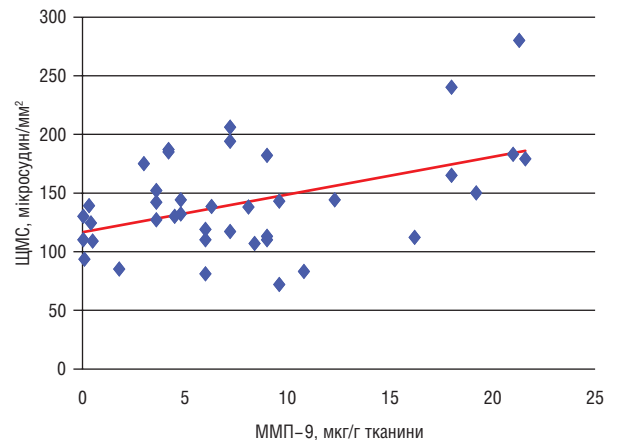


Рис. 5. Активність ММП-9 та ЩМС у тканині РШ

Таким чином, виявлено зв'язки між рівнем активності желатиназ і гіпоксіясоційованими показниками в РШ. Отримані результати підтверджують дані літератури про те, що гіпоксія (прямо чи опосередковано) бере участь у формуванні желатиназної активності в тканині РШ. Механізми такої регуляції потребують подальшого вивчення. Вона може відбуватися як на рівні синтезу, так і активації ММП. Відомо, що латентні форми ММП-2 і -9 мають у своєму складі продомени із консервативною послідовністю в активному центрі та залишком цистеїну і Zn²⁺. Активація профермента відбувається шляхом дисоціації зв'язку Zn²⁺-цистеїн. Такий розрив зв'язку може бути зумовлений гіпоксичним станом тканини, а саме взаємодією з радикальними формами кисню, що є тиол-модифікуючими

агентами та можуть активувати латентну форму фермента [17].

Проаналізовано зв'язок рівня активності желатиназ зі стадіями захворювання та з метастазуванням. Показано, що концентрація активної ММП-2 в пухлині зростає від I до II стадії захворювання майже в 2 рази ($p > 0,05$) і дещо знижується у III та IV стадії. У IV стадії в порівнянні зі стадією I концентрація активної ММП-9 підвищується в 1,7 рази, але різниця також є недостовірною ($p > 0,05$) (рис. 6). Концентрація активної форми ММП-2 перебуває у зворотній залежності від категорії M: для загальної кількості обстежених пацієнтів показано, що за відсутності віддалених метастазів концентрація активних форм ММП-2 в пухлині майже в 2 рази перевищує таку за наявності метастазів ($p < 0,05$), а для пацієнтів із захворюванням у IV стадії ці показники різняться майже в 4 рази ($p < 0,05$) (див. рис. 6). Максимальна активність латентних форм ММП-2 у пухлинах при M0 свідчить про значне посилення деструкції пухлинного матриксу на такому етапі розвитку пухлини, коли віддалені метастази клінічно не виявлені, тобто, можливо, відбувається їх формування та/або дисемінація ПК, що опосередковано підтверджується високими показниками активності ММП-2 в РШ у II стадії. Отримані результати співвідносяться з даними про здатність пухлини через відповідні сигнальні шляхи заздалегідь створювати сприятливе мікрооточення у передметастатичних «нішах» [20, 21].

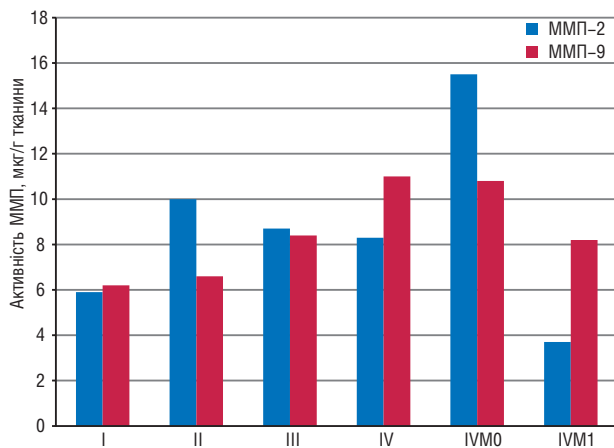


Рис. 6. Рівень активності желатиназ у тканині РШ на різних стадіях процесу

Не виявлено достовірної різниці між показниками концентрації активних форм желатиназ у пухлинах при категорії N0 та N1–2, тобто з відсутніми та наявними метастазами у регіонарних лімфатичних вузлах (РЛВ) (рис. 7). При дослідженні РЛВ на наявність прихованих ПК за допомогою ІГХ реакції на цитокератини мікрометастази було виявлено у 24% хворих на РШ категорії N0 [23]. Показано при цьому, що для хворих із СК⁺ РЛВ характерне достовірно вище (у 1,5 рази) значення активності ММП-2 в пухлині при зіставленні з такою у хво-

рих із СК⁻ РЛВ (див. рис. 7). Це вірогідно вказує на участь ММП-2 у метастазуванні ПК у РЛВ, що може бути використано для прогнозу метастазування: підвищена активність ММП-2 у первинній пухлині свідчить про метастазування у ЛВ навіть за умови категорії N0.

Раніше нами визначено [29], що пацієнти, у яких концентрація в пухлині активної ММП-2 < 2 мкг/г, а концентрація активної ММП-9 $< 4,5$ мкг/г, живуть достовірно довше ($p = 0,015$; $p = 0,004$ відповідно) порівняно з хворими, у пухлинах яких показники концентрації ММП високі. Встановлено, що концентрація активних форм желатиназ має прогностичне значення, зокрема при концентрації ММП-2 у пухлині < 2 мкг/г і ММП-9 $< 4,5$ мкг/г ризик несприятливого перебігу захворювання майже в 4 та 5 разів відповідно нижчий за такий при вищій концентрації ММП (hazard ratio — HR — 3,8; 95% confidence interval — CI — 0,78–8,2; $p < 0,05$ та HR 4,7; 95% CI 10,83–7,7; $p < 0,05$ відповідно). Отримані результати корелюють із даними літератури, що свідчать про стимулюючий вплив ММП на прогресування пухлинного процесу, зокрема на інвазію та метастазування різних злоякісних пухлин [11, 15, 24–28].

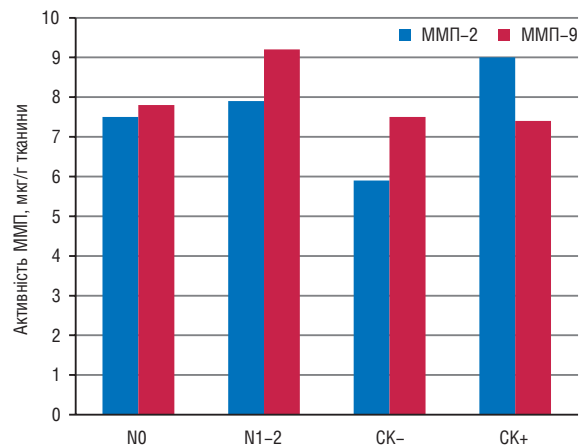


Рис. 7. Активність ММП-2 та -9 у тканині РШ за відсутності (N0) та наявності (N1–2) метастазів у РЛВ ($p > 0,05$) та із СК⁻ і СК⁺ ЛВ ($p < 0,05$ для ММП-2)

Таким чином, можна констатувати, що активність ММП корелює не лише з рівнем гіпоксії та експресією гіпоксіязалежних білків у пухлині, але й із тривалістю життя хворих на РШ, вказуючи на доцільність визначення активності ММП-2, асоційованої з дисемінацією ПК, та ММП-9, задіяної в ангіогенезі, для прогнозу раннього метастазування (зокрема в РЛВ) та перебігу захворювання.

ВИСНОВКИ

1. Для високої оксигенації пухлини ($PME/Pi > 2,0$) характерні низькі показники сумарної активності желатиназ, при збільшенні гіпоксії ($1,0 < PME/Pi < 2,0$) ці показники зростають відповідно у 4,5 рази. Сумарна активність ММП-2 та -9 корелює з експресією HIF-1α в РШ ($r = 0,58$; $p < 0,05$).

2. Виявлено пряму позитивну кореляцію між активністю ММП-9, з одного боку, та метаболічним показником РМЕ/РДЕ ($r = 0,44$; $p < 0,05$) і ШМС ($r = 0,46$; $p < 0,05$), з іншого.

3. Вміст активної ММП-2 зворотно корелює з категорією М. Не виявлено залежності між концентраціями активних желатиназ у пухлині та категорією N. Тоді як для хворих із СК⁺ (цитокератинпозитивними) ЛВ характерні достовірно вищі (у 1,5 раза) значення активності ММП-2 в пухлині порівняно з пацієнтами із СК⁻ (цитокератиннегативними) ЛВ.

3. Хворі на РШ, що мали концентрацію активної ММП-2 в пухлині < 2 мкг/г, а ММП-9 — $< 4,5$ мкг/г, живуть достовірно довше та мають нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж пацієнти з вищою концентрацією активних желатиназ.

4. Визначення показників активності ММП-2, асоційованої з дисемінацією ПК, та ММП-9, задіяної в ангиогенезі, може бути використано для оцінки раннього метастазування (зокрема в РЛВ) та в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Федоренко ЗП, Михайлович ЮЙ, Гулак ЛО та ін. Рак в Україні, 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцер-реєстру України, 2013; (14): 8, 28–9.

2. Macdonald JS, Cervantes A. New horizons for gastric cancer: commentary. Eur J Cancer Suppl 2006; 4(10): 1–2.

3. Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K. Insight into minimal residual disease in cancer patient: Implication for anti-cancer therapies. Eur J Cancer 2010; 46: 1189–97.

4. Hoeckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 266–76.

5. Ameri K, Luong R, Zhang H, et al. Circulating tumor cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype. Br J Cancer 2010; 102: 561–9.

6. Kakeji Y, Maehara Y, Shibahara K, et al. Clinical significance of micrometastasis in bone marrow of patients with gastric cancer and its relation to angiogenesis. Gastr Cancer 1999; 2: 46–51.

7. Dalton SJ, Whiting CV, Bailey JR, et al. Mechanisms of Chronic Skin Ulceration Linking Lactate, Transforming Growth Factor-beta, Vascular Endothelial Growth Factor, Collagen Remodeling, Collagen Stability, and Defective Angiogenesis. J Invest Dermatol 2007; 34: 1988–92.

8. McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 28 (4): 1432–8.

9. Ho FM, Liu SH, Lin WW, Liao CS. Opposite effects of high glucose on MMP-2 and TIMP-2 in human endothelial cells. J Cell Biochem 2007; 86: 1628–30.

10. Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. Front Biosci 2006; 11: 479–91.

11. Ганусевич ІІІ. Роль матриксних металлопротеиназ (ММП) при злоякісних новообразованиях. Характеристика ММП, регуляція їх активності, прогностическое значення. Онкологія 2010; 12(1): 10–6.

12. Kubben F, Sier C, Duijn W, et al. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. Br J Cancer 2006; 94: 1035–40.

13. Peña S. Matrix metalloproteinases as molecular markers in gastric cancer. Med Clin 2010; 134 (3): 123–6.

14. Wu CY, Wu MS, Chiang EP, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is better than serum matrix metallopro-

teinase-9 level to predict gastric cancer evolution. Clin Cancer Res 2007; 13: 2054–60.

15. Chu D, Zhang Z, Li Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer. Int J Cancer 2011; 129: 887–95.

16. Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, et al. Hypoxia level and matrix metalloproteinases-2 and -9 activity in Lewis lung carcinoma: correlation with metastasis. Exp Oncol 2005; 27: 202–5.

17. Burlaka A, Ganusevich I, Sidorik E, Osinsky S. Effects of radical oxygen species and NO: formation of intracellular hypoxia and activation of matrix metalloproteinases in tumor tissues. Exp Oncol 2006; 28: 49–53.

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

19. Vaupel P, Okunieff P, Kallinowski F, et al. Correlation between ³¹P-NMR spectroscopy and tissue O₂ tension measurements in a murine fibrosarcoma. Radiation Res 1989; 120: 477–93.

20. Muller MM and Fusenig NE. Friends or foes — bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nature Reviews 2004; 4: 839–49.

21. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, et al. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell 2000; 103: 481–90.

22. Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. Cell 1998; 94: 353–362.

23. 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. Онкологія 2013; 15(3): 230–4.

24. Zhi YH, Song MM, Wang PL, et al. Suppression of matrix metalloproteinase-2 via RNA interference inhibits pancreatic carcinoma cell invasiveness and adhesion. World J Gastroenterol 2009; 15: 1072–8.

25. Shaco-Levy R, Sharabi S, Benharroch D, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and beta-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2008; 139: 226–32.

26. Chen JS, Wang Q, Fu XH, et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. Hepatol Res 2009; 39: 177–86.

27. Pennanen H, Kuittinen O, Soini Y, et al. Prognostic significance of p53 and matrix metalloproteinase-9 expression in follicular lymphoma. Eur J Haematol 2008; 81: 289–97.

28. Kondakova IV, Klisho EV, Savenkova OV, et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 as the factor of head and neck tumor metastasis. Biomed Khim 2008; 54: 555–60.

29. Ганусевич ІІ, Гуменюк ЛД, Мамонтова ЛА та ін. Пухлиноасоційовані макрофаги та вміст активованих форм желатиназ у тканині раку шлунка: зв'язок з виживаністю хворих. Онкологія 2013; 15 (1): 14–9.

RELATIONSHIP OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 AND -9 WITH REGIONAL AND REMOTE METASTASIS OF HUMAN GASTRIC CANCER

I.I. Ganusevich, L.D. Gumeniuk, D.S. Osinsky,
A.V. Kovelskaya, L.N. Bubnovskaya,
L.A. Mamontova, S.P. Osinsky

Summary. Background: among proteins that are activated by the conditions of hypoxia, an important role in the metastasis of tumor belongs to matrix metalloproteinases (MMPs) in particular MMP-2 and -9, which

carry out the degradation of the extracellular matrix. **Objective:** to identify interrelation between of MMP activity in tumor tissue of the gastric cancer (GC), a clinical-pathological indices and hypoxia associated characteristics of the tumor (ratio of phosphomonoesters/inorganic phosphate (PME/Pi), phosphomonoesters/phosphodiester (PME/PDE), HIF-1 α , CD34), the presence of tumor cells in the lymphatic nodes (LN) and survival. **Methods:** immunohistochemistry, zimography, NMR-spectroscopy, statistical analysis. **Results:** satisfactory tumor oxygenation (ITRS/Ri > 2,0) is characterized by low total activity of MMP. When hypoxia increases ($1,0 < \text{ITRS/Ri} < 2,0$), MMP activity is about 4.5-fold elevated. The total activity of MMP-2 and -9 correlates with expression of HIF-1 α in CS ($r = 0,58$; $p < 0.05$). The direct positive correlation is demonstrated between the MMP-9 activity, on the one hand, and the metabolic indicator of the ITRS/PDE ($r = 0.44$; $p < 0.05$) and the density of microvessels ($r = 0.46$; $p < 0.05$), on the other. The content of the active MMP-2 is inversely correlated with the presence of metastases in the patients. The correlation between concentrations of active MMP in the tumor and the involvement of regional lymph nodes (RLN) has not been revealed. Nevertheless, for patients with cytoke-

ratin-positive (SC⁺) RLN, MMP-2 activity in tumor is 1.5 times as much as that in patients with cytoke-
negative (SK) RLN. The survival of the GC patients with the concentration of the active MMP-2 in tumor below 2 $\mu\text{g/g}$, and MMP-9 — less than 4.5 $\mu\text{g/g}$, is significantly higher with lower risk of unfavorable course of the disease compared with the patients with correspondingly higher concentration of active MMPs in the tumor. **Conclusion:** the assay of MMP-2 and -9 activity in the tumor can be used for prediction of early metastasis, in particular in RLN, and in monitoring the course of disease in patients GC.

Key Words: gastric cancer, matrix metalloproteinases, hypoxia, hypoxia-associated indices, metastasis, survival.

Адреса для листування:

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

Одержано: 29.01.2014