

Л.Д. Гуменюк¹
С.П. Меренцев²
І.І. Ганусевич¹

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, ІЛ-10, пухлиноасоційовані макрофаги, щільність мікросудин, виживаність хворих.

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ІЛ-10 У ЗВ'ЯЗКУ З ДЕЯКИМИ ФАКТОРАМИ ПУХЛИННОГО МІКРООТОЧЕННЯ ТА КЛІНІЧНИМ ПЕРЕБІГОМ РАКУ ШЛУНКА

Вивчення розвитку запальних процесів слизової оболонки, які в умовах імунного дисбалансу призводять до злоякісної трансформації епітелію, є одним з важливих аспектів дослідження патогенезу раку шлунка (РШ). В основі уникнення пухлиною імунного нагляду і неспроможності імунної відповіді лежать різні механізми, результатом яких є формування імносупресивного фону в пухлинному мікрооточенні. Перспективними для вивчення в цьому напрямку є цитокін інтерлейкін-10 (ІЛ-10) та взаємозв'язки його експресії з клітинними факторами пухлинного мікрооточення, зокрема пухлиноасоційованими макрофагами (ПАМ) та процесами неоваскуляризації. **Мета:** дослідити особливості експресії ІЛ-10 у тканині РШ залежно від клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу, визначити зв'язки між кількістю ІЛ-10-позитивних (ІЛ-10⁺) клітин та ПАМ і щільністю мікросудин (ЩМС) в тканині РШ, оцінити значення ІЛ-10⁺-клітин у клінічному перебігу захворювання. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на зразках пухлинної тканини 112 хворих на первинний РШ І–ІV стадії (рТ1–4рN0–2рM0–1), використано імуногістохімічні, статистичні методи. **Результати:** кількість ІЛ-10⁺-клітин є більшою на ранніх стадіях захворювання, а також у гіперваскуляризованих пухлинах та в пухлинах з великою кількістю ПАМ. Хворі на РШ, у пухлинах яких кількість ІЛ-10⁺-клітин < 45%, ПАМ < 23% та ЩМС < 142 мкс/мм² (при категорії Т1–3), живуть достовірно довше та мають нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж пацієнти із відповідно вищими показниками. **Висновки:** кількість ІЛ-10⁺-клітин в пухлині асоційована з пропухлинними факторами мікрооточення (ПАМ та ЩМС) та в сукупності з ними може бути використана в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ з метою корекції протипухлинної терапії.

ВСТУП

Рак шлунка (РШ) є одним з найпоширеніших онкологічних захворювань із високою летальністю, що зумовлено пізньою діагностикою. Шлунковий канцерогенез — складний багатоетапний процес, що в тому числі включає поліетіологічний розвиток запальних процесів слизової оболонки, які в умовах імунного дисбалансу призводять до онкологічної трансформації епітелію шлунка. Протягом останніх років активно досліджуються тканинні та генетичні зміни медіаторів імунітету, цитокінів при пухлинах різної локалізації. Цитокіни, маючи здатність регулювати процеси функціональної активності клітин, проліферації, диференціації, ангіогенезу, а також здійснювати міжклітинні і міжсистемні взаємодії, визначати тип, силу та тривалість імунної відповіді, можуть зумовлювати як про-, так і протипухлинні ефекти.

В основі уникнення пухлиною імунного нагляду і неспроможності імунної відповіді лежать різні механізми, результатом яких є формування ім-

носупресивного фону в пухлинному мікрооточенні. Добре відома здатність самих пухлинних клітин продукувати фактори імунної супресії. Перспективним для вивчення в цьому напрямку є інтерлейкін-10 (ІЛ-10) [1] — важливий імунорегуляторний цитокін, який продукується головним чином активованими Т-клітинами, моноцитами, В-клітинами і тимоцитами. Маючи властивості модулятора, ІЛ-10 може як стимулювати, так і пригнічувати імунну відповідь при пухлинній прогресії [2]. Показано, що підвищення концентрації ІЛ-10 в плазмі крові може зумовлювати розвиток пухлини шляхом запобігання презентації пухлинних антигенів, захищаючи їх від CD8-цитотоксичних лімфоцитів. Самі пухлинні клітини солідних злоякісних новоутворень здатні продукувати ІЛ-10, при цьому відзначається негативна роль ІЛ-10 для організму. Так, за даними Н. Hatanaka та співавторів, у ІЛ-10-трансгенних мишей пухлини більш агресивні, а введення лімфоцитів від цих мишей призводить до прискорення росту пухлини. З іншого боку, антиангіогенні ефекти ІЛ-10 можуть зу-

мовлювати протективний і превентивний вплив щодо виникнення і росту злоякісних пухлин [3].

Однією з головних ознак запалення, пов'язаного з пухлинним процесом, є наявність у пухлині макрофагів. Більшість прогресуючих солідних пухлин активно інфільтровані ними. Макрофаги походять від циркулюючих моноцитів, які селективно залучаються у пухлинне мікрооточення факторами хемотаксису. За певних умов макрофаги здатні поляризуватися у дві субпопуляції — M1 та M2, перші з яких мають властивість знищувати пухлинні клітини, другі — стимулювати ріст пухлини [4–6]. Макрофаги, присутні в злоякісних пухлинах, належать головним чином до макрофагів M2 — так званих пухлиноасоційованих макрофагів (ПАМ) [7]. Вони характеризуються вираженою здатністю адаптуватися до гіпоксичних умов. Дефіцит кисню може викликати зниження мобільності ПАМ, сприяючи їх накопиченню в гіпоксичних ділянках, при цьому спостерігається супресія проти-пухлинної активності ПАМ. У помірно оксигенованих ділянках пухлини ПАМ можуть відігравати роль як негативних, так і позитивних регуляторів росту пухлини [7–9]. Таким чином, наявні дані свідчать про неоднозначність «поведінки» ПАМ та IL-10 залежно від мікрооточення пухлини.

Метою роботи було дослідити особливості експресії IL-10 залежно від клініко-патологічних показників, зв'язок між кількістю IL-10-позитивних (IL-10⁺) клітин у тканині РШ і такими факторами мікрооточення пухлини, як кількість ПАМ та щільність мікросудин (ЩМС), оцінити значення IL-10⁺-клітин у клінічному перебігу захворювання.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження використовували операційний матеріал (зразки пухлинної тканини) 112 хворих на первинний РШ, які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі МОЗ України з 2008 по 2015 р. Пацієнти не отримували передопераційної терапії. Стадію захворювання визначали відповідно до номенклатури TNM [10], гістологічну класифікацію пухлини — згідно з рекомендаціями WHO [11]. Хворі були проінформовані та дали згоду на використання матеріалу з дослідницькою метою. Клінічні характеристики пацієнтів із РШ наведено у табл. 1.

Імуногістохімічним (ІГХ) методом у тканині РШ досліджували кількість IL-10⁺-клітин, кількість ПАМ (CD68⁺-клітин) та ЩМС (CD34⁺-клітин). Зразки тканини РШ фіксували в 4% забуференому розчині нейтрального формаліну і заливали в парафін. Парафінові зрізи товщиною 4–6 мкм були монтовані на скельця з адгезивними властивостями («SuperFrost Plus», ФРН). У день проведення ІГХ реакції здійснювали депарафінування та зневоднення зрізів. Для оптимального ІГХ визначення експресії маркера проводили демаскування антигену шляхом обробки зрізів у мікрохвильовій печі в розчині цитратного буфера (рН 6,0). Як первинні використовували МкАТ проти IL-10 (клон 9E10, «Diagnostic BioSystems») [1:10],

Таблиця 1

Розподіл хворих за клініко-патологічними характеристиками

Показник	Кількість хворих		
	n	%	
Стать, n = 112 (100%)	Чоловіки	75	67
	Жінки	37	33
Категорія pT, n = 112 (100%)	T1	4	4
	T2	20	18
	T3	63	56
	T4	25	22
Категорія pN, n = 112 (100%)	N0	54	48
	N1	23	21
	N2	35	31
Категорія M, n = 112 (100%)	M0	99	88
	M1	13	12
Стадія (pTNM), n = 112 (100%)	I	19	17
	II	32	29
	III	34	30
	IV	27	24
Гістологічна структура пухлини, n = 112 (100%)	Аденокарцинома	66	60
	Слизивий рак	6	5
	Перснеподібно-клітинний рак	6	5
	Недиференційований рак	34	30
Ступінь диференціації (pG), n = 112 (100%)	G1	4	4
	G2	24	21
	G3	50	45
	G4	34	30
Анатомічна локалізація пухлини, n = 112 (100%)	Верхня третина шлунка	20	18
	Середня третина шлунка	31	28
	Нижня третина шлунка	56	50
	Тотальне ураження	5	4

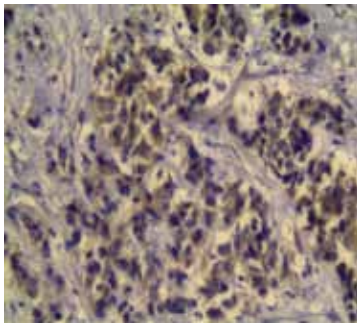
проти CD68 (клон PG-M1, «DakoCytomation», Данія) [1:80], проти CD34 (клас II, клон QBEnd, «DakoCytomation», Данія) [1:100]. Через 1 год зрізи 3 рази відмивали від незв'язаних первинних антитіл у PBS (phosphate-buffered saline). Далі скельця зі зрізами інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хв із застосуванням як вторинних реагентів із системи PolyVueHRP Detection System Components («Diagnostic BioSystems», США). Як субстрат-хромоген використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлорид (ДАБ). Препарати додатково забарвлювали гематоксилином Майєра. Візуалізацію результатів ІГХ реакції проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа Axioscop (Zeiss) при збільшенні $\times 160$, $\times 400$. Результат ІГХ забарвлення оцінювали напівкількісним методом. У кожному препараті підраховували ≈ 1000 клітин і визначали відсоток позитивних клітин (IL-10, CD68). Відповідно до значення медіани CD68⁺-клітин (23%) виділяли умовно малу та велику кількість ПАМ [21]. Підрахунок кількості CD34⁺-клітин проводили за N. Wiedner та співавторами [12], обчислюючи кількість мікросудин на 1 мм² (мкс/мм²). Рівень неоваскуляризації оцінювали відповідно до значення медіани ЩМС (133 мкс/мм²), умовно класифікували пухлини як гіповаскуляризовані (< 133 мкс/мм²) та гіперваскуляризовані (≥ 133 мкс/мм²) [21].

Статистичний аналіз проводили за допомогою пакетів прикладних програм Statistica 6.0 та Prism version 4.3. Вживаність хворих визначали за методом Каплана — Мейєра, розбіжності між кривими вживаності аналізували за допомогою log-rank

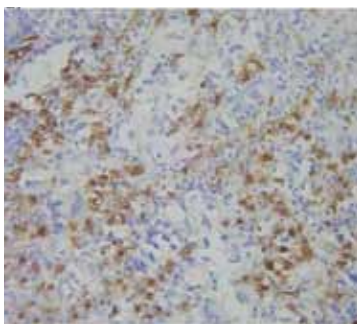
тесту з використанням χ^2 . Статистична значущість прийнята при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

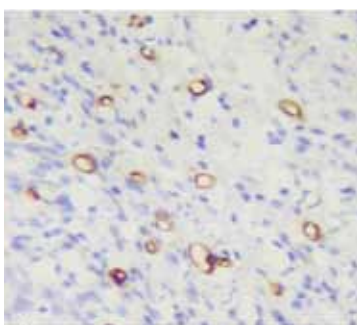
Позитивну реакцію з МкАТ, специфічними до IL-10, виявлено в усіх досліджених зразках пухлини (рис. 1, а). Кількість IL-10⁺-клітин варіювала в межах 10–80%, значення медіани становило 40%, середнє значення — $42 \pm 2\%$. Також у пухлинах усіх обстежених хворих визначено кількість CD68⁺- (ПАМ) (рис. 1, б) та CD34⁺-клітин (ЩМС) (рис. 1, в). Середнє значення CD68⁺-клітин у пухлинній тканині становило $24 \pm 1\%$, медіана — 23% при розкиді значень $2 \div 90\%$. Виявлено, що ЩМС не є однорідною в тканині РШ і характеризується значною варіабельністю. Зокрема, кількість мікросудин на 1 мм² варіює від 22 до 367 мкс/мм² (медіана 133 мкс/мм²), середнє значення 144 ± 5 мкс/мм².



а



б



в

Рис. 1. ІГХ виявлення клітин в тканині РШ: а — IL-10⁺; б — CD68⁺; в — CD34⁺. 36. × 400

Показники кількості IL-10⁺-клітин, ПАМ та ЩМС у пухлинній тканині залежно від клініко-патологічних характеристик хворих на РШ наведено в табл. 2.

Як свідчать результати порівняльного аналізу, кількість IL-10⁺-клітин у пухлинній тканині не відрізняється суттєво та/або достовірно залежно від віку

(вікові категорії <63—>63), статі хворих, анатомічної локалізації пухлини, її гістологічної структури та ступеня диференціювання (G), категорії (T), наявності регіонарних (N) і віддалених метастазів (M), стадії захворювання (TNM).

Таблиця 2

Клініко-патологічні характеристики хворих на РШ та кількість IL-10⁺-, CD68⁺-, CD34⁺-клітин у пухлині

Показник	IL-10 ⁺ M ± m, %	CD68 ⁺ (ПАМ) M ± m, %	CD34 ⁺ (ЩМС) M ± m, мкс/мм ²
<i>Стать</i>			
Чоловіки	46 ± 3	23 ± 1	145 ± 6
Жінки	38 ± 3	24 ± 2	138 ± 8
<i>Гістологічна структура</i>			
Аденокарцинома	44 ± 3	24 ± 1	137 ± 5
Слизовий рак	43 ± 6	21 ± 3	144 ± 22
Персноподібно-клітинний рак	34 ± 5	23 ± 2	147 ± 16
Недиференційований рак	50 ± 3	22 ± 2	173 ± 15*
<i>Категорія pT</i>			
T1–2	50 ± 6	20 ± 2	149 ± 10
T3–4	41 ± 2	25 ± 1*	142 ± 5
<i>Категорія pN</i>			
N0	43 ± 3	22 ± 1	150 ± 6
N1–2	42 ± 3	26 ± 1*	137 ± 7
<i>Категорія M</i>			
M0	44 ± 2	23 ± 1	145 ± 5
M1	32 ± 6	29 ± 3*	130 ± 12
<i>Стадія (pTNM)</i>			
I	50 ± 7	20 ± 2	149 ± 11
II	45 ± 4	23 ± 2	149 ± 9
III	40 ± 4	23 ± 2	141 ± 8
IV	40 ± 4	27 ± 2*	137 ± 10
<i>Ступінь диференціювання (pG)</i>			
G1–2	46 ± 6	22 ± 2	140 ± 7
G3–4	42 ± 2	24 ± 1	144 ± 5
<i>Анатомічне розташування пухлини</i>			
Верхня третина шлунка	45 ± 7	25 ± 2	144 ± 12
Середня третина	38 ± 4	21 ± 2	139 ± 9
Нижня третина	44 ± 3	24 ± 1	146 ± 6
Тотальне ураження	33 ± 11	25 ± 4	146 ± 24

Примітки: * $p < 0,05$.

При цьому слід зазначити наявність деяких тенденцій, зокрема більшої кількості IL-10⁺-клітин у тканині РШ чоловіків порівняно із жінками: 46 ± 3 та $38 \pm 3\%$ відповідно ($p = 0,07$). Спостерігається тенденція до оберненої залежності між кількістю IL-10⁺-клітин та наявністю віддалених метастазів (M). Проте менша кількість IL-10⁺-клітин у тканині РШ хворих із категорією M1 порівняно з хворими без виявлених метастазів (M0) — 32 ± 6 та $44 \pm 2\%$ мала недостатній рівень статистичної значущості ($p = 0,08$).

Разом з тим кількість CD68⁺-клітин (ПАМ) є достовірно більшою у хворих як з категорією M1, так і з категорією N1, порівняно з хворими з категорією M0 та N0 відповідно. Також кількість CD68⁺-клітин у тканині РШ є більшою в пухлинах T3–4 порівняно з T1–2 ($p < 0,05$). Відмічено більшу кількість CD68⁺-клітин у пацієнтів із IV стадією захворювання порівняно з хворими з I стадією ($p < 0,05$). Зв'язок кількості IL-10⁺-клітин у тканині РШ зі стадією злоякісного процесу має тенденцію до зворотної закономірності: $47 \pm 3\%$ (I–II стадії) та $40 \pm 3\%$ (III–IV стадії), при недостатньому рівні значущості ($p = 0,07$) (рис. 2, 3). Отже, для

кількості IL-10⁺-клітин та ПАМ характерна різноспрямованість взаємозв'язків з деякими клініко-патологічними характеристиками хворих на РШ. Можливо, це пов'язано з тим, що функціональне імуносупресивне значення IL-10 найбільше проявляється саме на ранніх етапах пухлинного процесу, але недостатній рівень статистичної значущості виявлених закономірностей не дозволяє зробити однозначні висновки.

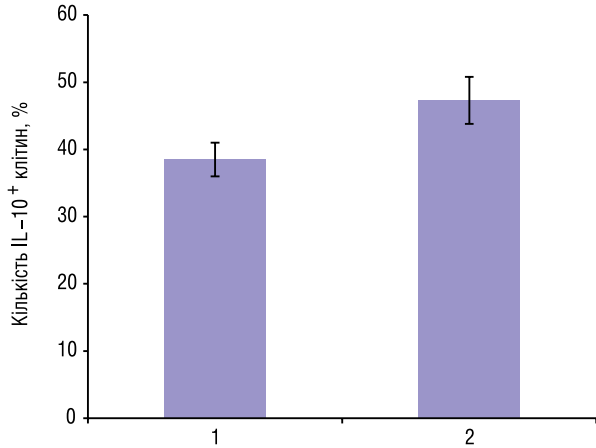


Рис. 2. Кількість IL-10⁺-клітин та рівень неоваскуляризації тканини РШ ($p = 0,01$): 1 — гіпо-, 2 — гіперваскуляризовані пухлини шлунка

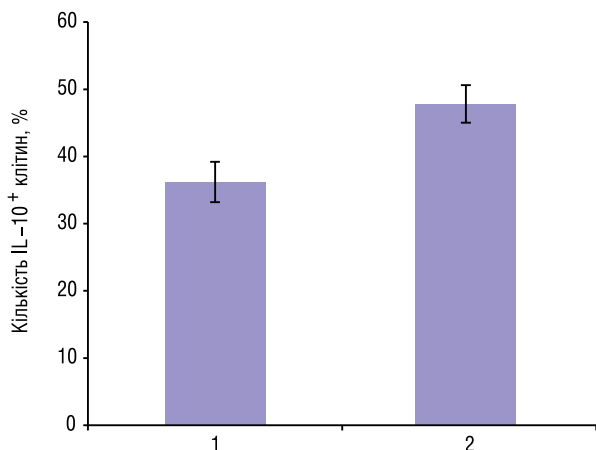


Рис. 3. Кількість IL-10⁺-клітин та рівень ПАМ у тканині РШ: 1 — мала кількість ПАМ; 2 — велика кількість ПАМ ($p = 0,006$)

Характерно, що ЩМС у тканині недиференційованого РШ (173 ± 15 мкс/мм²) є достовірно вищою, ніж в аденокарциномі (137 ± 5 мкс/мм²) ($p < 0,05$). Збільшення кількості IL-10⁺-клітин у тканинах недиференційованого раку ($50 \pm 3\%$) порівняно з аденокарциномою ($44 \pm 3\%$) має недостатній рівень статистичної значущості ($p = 0,07$). Спостерігається тенденція до оберненої залежності між ЩМС та наявністю регіонарних метастазів (N) і стадією пухлинного процесу (pTNM) ($p = 0,07$). Таким чином, для показників ЩМС і кількості IL-10⁺-клітин відзначається тенденція до односпрямованості взаємозв'язків із деякими клініко-патологічними характеристиками.

Аналіз кількості IL-10⁺-клітин в пухлинній тканині шлунка залежно від ступеня неоваскуляризації пухлини виявив, що в гіперваскуляризованих пухлинах біль-

ша кількість IL-10⁺-клітин ($47,3 \pm 3,5\%$), ніж в гіповаскуляризованих ($38,5 \pm 2,5\%$) ($p < 0,05$). Встановлено, що в пухлинах, які характеризуються наявністю великої кількості ПАМ ($\geq 23\%$ CD68⁺-клітин), кількість IL-10⁺-клітин була більшою ($47,5 \pm 2,8\%$), ніж в пухлинах з малою кількістю ПАМ IL-10⁺-клітин ($35,9 \pm 3,0\%$) ($p < 0,01$). Ці дані опосередковано свідчать про те, що пропухлинні властивості IL-10 переважають над протипухлинними при РШ. Зокрема, подібність характеру взаємозв'язків кількості IL-10⁺-клітин та ЩМС у пухлинній тканині з деякими клініко-патологічними характеристиками хворих і виявлений прямий кореляційний зв'язок між IL-10 та ЩМС можуть свідчити про вплив IL-10 на процеси неоваскуляризації у РШ. Також пропухлинні властивості IL-10 підтверджуються наявністю прямої кореляції між кількістю IL-10⁺-клітин та CD68⁺-клітин (ПАМ), а тенденція до різноспрямованості цих показників при різних ступенях поширення пухлинного процесу РШ може бути зумовлена тим, що IL-10 експресується як макрофагами, так і пухлинними клітинами.

Загальна виживаність (ЗВ) хворих із пухлинами, що характеризуються кількістю IL-10⁺-клітин $< 45\%$, є достовірно вищою, ніж пацієнтів з кількістю IL-10⁺-клітин $\geq 45\%$ (рис. 4). Хворі, у пухлинах яких виявлено меншу кількість IL-10⁺-клітин, мають майже в 2 рази нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання (hazard ratio — HR), ніж ті, у яких більша кількість IL-10⁺-клітин в пухлині (HR = 1,8; 95% confidence interval (CI) 0,56–4,25; $p < 0,05$).

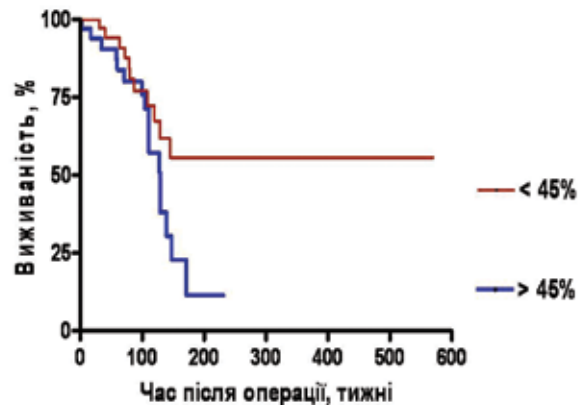


Рис. 4. ЗВ хворих на РШ залежно від кількості IL-10⁺-клітин в пухлині (log-rank test, $\chi^2=3,719$; $p = 0,05$)

Тривалість життя хворих, в пухлинах яких виявлено велику кількість ПАМ, була значно меншою ($p < 0,001$), ніж в групі пацієнтів з малою кількістю ПАМ (рис. 5). Ризик несприятливого перебігу захворювання у пацієнтів, у пухлинах яких виявлено велику кількість ПАМ, зростає більш ніж у 2 рази (HR = 2,4; 95% CI 0,86–7,27; $p < 0,05$).

Не виявлено відмінностей в тривалості життя хворих на РШ з гіпо- та гіперваскуляризованими пухлинами ($</\geq 133$ мкс/мм²). Враховуючи виявлені особливості ЩМС у пухлинах із різним ступенем ураження стінки шлунка (категорія T), ми провели також аналіз ЗВ в групах пацієнтів категорій T1–3 залежно

від рівнів ЩМС у пухлині. У результаті виявлено, що тривалість життя хворих категорій T1–3 з гіповаскуляризованими пухлинами була вірогідно більшою, ніж пацієнтів з гіперваскуляризованими злоякісними утвореннями (рис. 6). Таким чином, значення ЩМС у пухлинній тканині як прогностичного фактора у хворих на РШ може бути адекватним при врахуванні ступеня ураження стінки шлунка (категорії T).

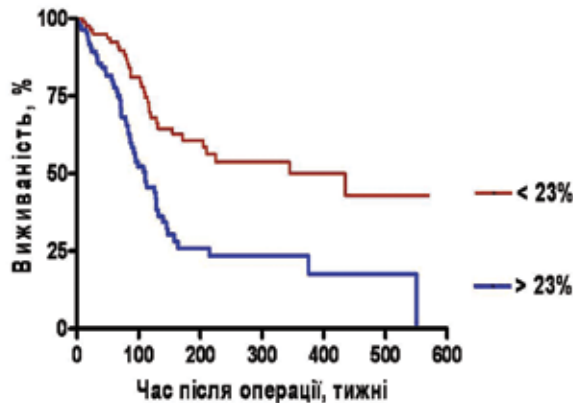


Рис. 5. ЗВ хворих на РШ залежно від кількості ПАМ (CD68⁺-клітин) у пухлині (log-rank test, $\chi^2 = 16,7$; $p < 0,001$)

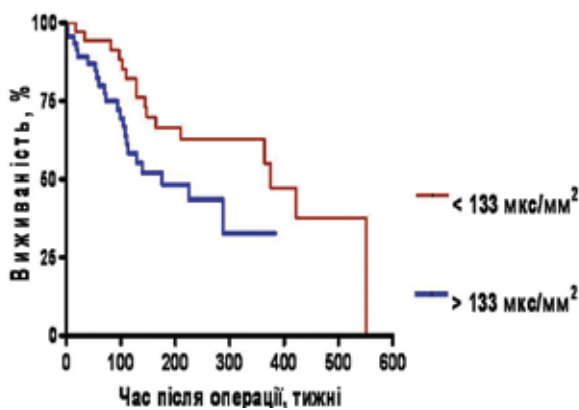


Рис. 6. ЗВ хворих на РШ категорій T1–3 залежно від ЩМС в пухлині (log-rank test, $\chi^2 = 3,85$; $p = 0,049$)

У дослідженнях G. Pawelec показано, що деякі імуносупресивні цитокіни, такі як трансформуючий фактор росту β (TGF- β) і IL-10, секретуються пухлинними клітинами і пов'язані з імуносупресією [1]. При цьому, за даними H. Saito та співавторів, підвищена експресія TGF- β_1 у тканині РШ корелює з поганим прогнозом [13]. Виявлено, що гіперекспресія IL-10 в пухлині відмічається при онкологічних захворюваннях різної етіології, в тому числі при раку легень і меланомі [14, 15]. Крім того, показано, що експресія IL-10 достовірно корелює з поганим прогнозом при недрібноклітинному раку легень [14]. Однак кількість досліджень щодо прогностичної значущості IL-10 при РШ вкрай обмежена. У цій роботі виявлено досить високий відсоток IL-10⁺-клітин у тканині РШ. Велика кількість IL-10⁺-клітин є характерною для пухлин хворих без віддалених метастазів та I–II стадії раку, що може свідчити про імуносупресивну дію IL-10 уже на ранніх стадіях пухлинного процесу.

Ріст та метастазування злоякісних пухлини, як відомо, залежать від неоваскуляризації пухлини [16].

Ступінь ангиогенезу пухлини пов'язаний із клінічними характеристиками хворих на недрібноклітинний рак легень, РШ [17], стравоходу [18] і товстої кишки [19]. У дослідженнях T. Sakamoto та співавторів у пухлинах шлунка виявлено прямий кореляційний зв'язок між експресією IL-10 та VEGF (фактор росту ендотелію судин) [20]. Нещодавно було показано, що IL-10 зумовлює васкуляризацію через експресію ангіопоетину 1 і 2 та рецептора ангіопоетину (TIE2) при недрібноклітинному раку легень [3]. Отримані нами дані щодо подібності характеру взаємозв'язків кількості IL-10⁺-клітин та ЩМС у тканині РШ з деякими клініко-патологічними характеристиками хворих і виявлений прямий кореляційний зв'язок між IL-10 та ЩМС можуть свідчити про вплив IL-10 на процеси неоваскуляризації у РШ.

Велика кількість ПАМ є характерною для категорій T3–4 пухлин та IV стадії захворювання, а також пов'язана з регіонарним та віддаленим метастазуванням і ЗВ хворих на РШ. Отже, прогресування РШ супроводжується підвищенням рівнів інфільтрації пухлини макрофагами. Відомо, що ПАМ можуть продукувати низку цитокінів, зокрема IL-10. Виявлений в наших дослідженнях прямий кореляційний зв'язок між кількістю ПАМ та IL-10 у пухлині шлунка, а також нижча виживаність хворих на РШ, у яких ці показники є високими, свідчать про імуносупресивну роль ПАМ та IL-10 та про вихід пухлини з-під імунного контролю при РШ.

У роботі T. Sakamoto та співавторів виявлено, що гіперекспресія IL-10 була незалежним прогностичним фактором при РШ [20]. Отримані нами результати співвідносяться з вищенаведеними даними: у нашому дослідженні велика кількість (> 45%) IL-10⁺-клітин у пухлині шлунка достовірно корелює з поганим прогнозом захворювання.

Таким чином, у представленій роботі показано, що рівень IL-10 в пухлині пов'язаний з пропухлинними факторами мікрооточення (ПАМ, ЩМС), а високі рівні його експресії асоційовані з несприятливим перебігом РШ. Визначення кількості IL-10⁺-клітин у пухлині, з урахуванням пропухлинної ролі IL-10, може бути використане в контролі за перебігом РШ з метою корекції схем протипухлинної терапії.

ВИСНОВКИ

1. Кількість IL-10⁺-клітин і ЩМС у пухлині мають позитивний односпрямований зв'язок із деякими клініко-патологічними характеристиками хворих на РШ, зокрема зі статтю, стадією захворювання (pTNM) та гістологічним типом пухлини.

2. Виявлено, що більша кількість IL-10⁺-клітин характерна для гіперваскуляризованих пухлин (≥ 133 мкс/мм²) та пухлин із великою кількістю ПАМ ($\geq 23\%$).

3. Встановлено, що у хворих на РШ, пухлини яких характеризуються кількістю IL-10⁺-клітин $\geq 45\%$, CD68⁺-клітин (ПАМ) $\geq 23\%$ та ЩМС (при категоріях T1–3) ≥ 142 мкс/мм², тривалість життя є меншою, зростає ризик несприятливого перебігу захворювання.

4. Визначення кількості IL-10⁺-клітин у пухлині, з урахуванням пропухлинної ролі IL-10, може бути використане для контролю за перебігом РШ з метою корекції схем протипухлинної терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Pawelec G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53**: 262–74.
2. Sharma S, Stolina M, Lin Y, *et al.* T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 1999; **163**: 5020–8.
3. Hatanaka H, Abe Y, Naruke M, *et al.* Significant correlation between interleukin 10 expression and vascularization through angiopoietin/TIE2 networks in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1287–92.
4. Allavena P, Siva A, Solinas G, *et al.* The inflammatory microenvironment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; **66**: 1–9.
5. Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 71–8.
6. Mantovani A. La mala educación de tumor-associated macrophages: diverse pathways and new players. *Cancer Cell* 2010; **17**: 111–2.
7. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, *et al.* Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 717–27.
8. Lewis C, Murdoch C. Macrophages responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005; **167**: 627–35.
9. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 2008; **264**: 204–15.
10. International Union Against Cancer, TNM Classification of Malignant Tumors, 6th edition. *L.H. Sobin and C. Wittekind*, Eds. Wiley-Liss, New York, NY, USA, 2002.
11. Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, *et al.* Gastric carcinoma, in World Health Organization Classification of Tumors. Tumors of the Stomach. *S.R. Hamilton and L.A. Aaltonen*, Eds., vol. 3, chapter 3, pp. 39–52, IARC Press, Lyon, France, 2000.
12. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis. Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; **324**: 1–8.
13. Saito H, Tsujitani S, Oka S, *et al.* The expression of transforming growth factor- β 1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999; **86**: 1455–62.
14. Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, *et al.* Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2000; **11**: 815–19.
15. Dummer W, Bastian BC, Ernst N, *et al.* Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer* 1996; **66**: 607–10.
16. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 4–6.
17. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, *et al.* Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; **340**: 145–6.
18. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, *et al.* Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; **79**: 220–5.
19. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, *et al.* Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997; **132**: 541–6.
20. Sakamoto T, Saito H, Tatebe S, *et al.* Interleukin-10 expression significantly correlates with minor CD8⁺ T-cell infiltration and high microvessel density in patients with gastric cancer. *J Cancer* 2006; **118**: 1909–14.

21. Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I. Hypoxia tumor associated macrophages, microvessel density VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin Trans Oncol* 2011; **13** (2): 133–8.

PECULIARITY OF THE EXPRESSION OF IL-10 IN CONNECTION WITH SOME FACTORS OF THE TUMOR MICROENVIRONMENT AND THE CLINICAL COURSE OF GASTRIC CANCER

L.D. Gumenyuk, S.P. Merentsev, I.I. Ganusevich

Summary. A study of the development of inflammatory processes of the mucous membrane, which in conditions of immune imbalance, leading to malignant transformation of the epithelium, is one of the important aspects of the pathogenesis of gastric cancer (GC). The basis of avoidance of tumor immune surveillance and the failure of the immune response are different mechanisms that result in the formation of immunosuppressive background of tumor microenvironment. Perspective in this respect is the exploring of the cytokine interleukin-10 (IL-10) and the relationship of its expression with cell factors of tumor microenvironment particular tumor-associated macrophages (TAM) and the process of neovascularization. **Objective:** to investigate the features of expression of IL-10 in the tissue of GC depending on the clinical and pathological characteristics of the tumor process, to determine relationships between the number of IL-10-positive (IL-10⁺) cells and TAM and microvascular density (MVD) in tissue GC, to assess the importance of IL-10⁺ cells in the clinical course of the disease. **Object and methods:** the study was conducted on samples of tumor tissue of 112 patients in the primary GC I–IV stage (pT1–4pN0–2pM0–1), immunohistochemical and statistical methods were used. **Results:** the number of IL-10⁺ cells are more in the early stages of the disease, as well as in hyper vascularized tumors and tumors with a large amount of TAM. Patients with GC, in tumors where the number of IL-10⁺ cells were < 45%, TAM < 23% and MVD < 142 mcv/mm² (with categories T1–3), live significantly longer and have lower risk of adverse course of the disease than patients with correspondingly higher rates. **Conclusions:** the number of IL-10⁺ cells in the tumor is associated with protumor factors in the microenvironment (TAM and MVD), and combined with them can be used in monitoring the course of disease in patients with GC for correction antitumor therapy.

Key Words: gastric cancer, IL-10, tumor-associated macrophages, microvascular density, survival.

Адреса для листування:

Гуменюк Л.Д.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: gumenyuk_ld@ukr.net

Одержано: 01.02.2017