

І.І. Ганусевич¹
Л.А. Мамонтова¹
А.В. Ковельська¹
Л.Д. Гуменюк¹
С.П. Меренцев²
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: матриксні металопротеїнази, мікрооточення пухлини, мінімальна залишкова хвороба, рак шлунка.

МАТРИКСНІ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ ЯК ФАКТОРИ СТРОМАЛЬНОГО МІКРООТОЧЕННЯ ПУХЛИНИ: РОЛЬ У ПЕРЕБІГУ МІНІМАЛЬНОЇ ЗАЛИШКОВОЇ ХВОРОБИ ПРИ РАКУ ШЛУНКА

Матриксні металопротеїнази (ММП) активуються за умов гіпоксії, є фактором мікрооточення пухлинних клітин у первинній пухлині та місцях віддаленого метастазування, забезпечують дисемінацію пухлинних клітин. Сьогодні особливий інтерес онкологів сфокусований на вивченні ММП як тригерів виходу дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) зі «сплячого» стану при мінімальній залишковій хворобі (МЗХ). **Мета:** дослідити залежності між показниками активності желатиназ у пухлині та кістковому мозку (КМ) і деякими гіпоксія-асоційованими факторами мікрооточення при раку шлунка (РШ), виявити зв'язки між рівнями активності желатиназ у КМ хворих на РШ та стадіями захворювання, рівнем метастазування, наявністю ДПК у КМ; а також визначити залежності між показниками активності желатиназ у КМ і тривалістю життя пацієнтів для можливого їх використання при прогнозі перебігу МЗХ. **Об'єкт і методи:** досліджено 282 хворих на РШ (174 чоловіки, 108 жінок), яких розподілили за стадіями захворювання таким чином: 48 осіб — I, 80 — II, 85 — III, 69 — IV стадія. Використано методи зимографії в поліакриламідному гелі, імуногісто- та імуноцитохімічні. У статистичній обробці використані t-критерій Стьюдента, кореляційний аналіз, аналіз виживаності за Капланом — Мейєром. **Результати:** виявлено кореляції між активністю ММП-2 та -9 у КМ хворих на РШ, з одного боку, та експресією гіпоксія-асоційованих білків (HIF-1), щільністю мікросудин за експресією CD34 та Flt-1 у пухлинах, з іншого ($r = 0,30-0,51$; $p < 0,05$). Рівні активності желатиназ у КМ хворих на РШ не корелюють із показниками як метастазування у лімфатичні вузли, так і віддаленого метастазування ($p > 0,05$). Для всіх досліджених пацієнтів, а також для тих із них, у кого клінічно не виявлено віддалених метастазів (категорія M_0), достовірно підтверджено зв'язок наявності ДПК із ММП-2. Активність останньої в КМ за відсутності ДПК була майже у 3 рази нижчою за активність у КМ з наявними ДПК. Пацієнти, які не проходили післяопераційну терапію, з активністю ММП-2 у КМ $< 2,8$ у.о. живуть достовірно довше, ніж пацієнтки з вищою активністю ($p = 0,016$). Пацієнти з активністю ММП-9 у КМ $< 3,0$ у.о. живуть довше, ніж з вищою активністю, хоча різниця недостовірна ($p = 0,218$). При цьому як за відсутності, так і за наявності ДПК у КМ кращу загальну 3-річну виживаність відзначено у групах з активністю ММП-2 $< 3,6$ та $< 4,8$ у.о. відповідно. Вірогідно, в першому випадку ММП-2 контролює дисемінацію, а в другому — вихід ДПК зі «сплячого» стану. **Висновки:** желатинази КМ є гіпоксія-асоційованими факторами мікрооточення при РШ; ММП-2 у КМ хворих на РШ асоційована з дисемінацією пухлинних клітин і є маркером МЗХ; ММП-2 та -9 у КМ можуть бути використані для контролю перебігу захворювання у пацієнтів із РШ.

ВСТУП

Відомо, що через низку чинників, механізми дії яких загалом недостатньо вивчені, пухлинні клітини (ПК) модулюють своє мікрооточення, стимулюючи стромальні клітини до секреції додаткових

факторів і ферментів, зокрема протеаз, які створюють відповідні умови для пухлинної прогресії [1–3]. Таким чином, сигнали мікрооточення забезпечують інвазію та віддалене метастазування пухлини [4, 5]. Ключові медіатори цих процесів — ферменти під-

родини матриксних металопротеїназ (ММП) [6], що забезпечують регуляцію пухлинного росту, ремоделювання тканин, процеси запалення, інвазію та метастазування. Сучасні дослідження дозволяють вважати ММП не лише фактором мікрооточення, сприятливого для ПК, але й регулятором сигнальних шляхів, через які відбувається контроль розповсюдження пухлини [6–8].

Метастазування пухлини являє собою багатоступеневий процес, шляхом якого ПК дисемінують із первинної пухлини до віддалених вторинних органів і тканин. ПК реалізують свій метастатичний потенціал після набуття властивостей, що дозволяють їм дисемінувати — відриватися від первинної пухлини, мігрувати в навколишні тканини та судини, циркулювати в судинному руслі, досягати вторинних сайтів, екстравазувати та стабілізуватися в метастатичний центр. Кожен із цих етапів забезпечується важливою функціональною участю ММП, зокрема желатиназ [9]. У процесі дисемінації ПК включаються у низку взаємодій як безпосередньо із власне екстрацелюлярним матриксом (ЕЦМ), так і з його протеїнами, асоційованими з ним факторами росту, цитокінами, базальними мембранами, клітинами ендотелію, циркулюючими клітинами крові, мікрооточенням вторинного сайту, де ПК у кінцевому рахунку заміщують нормальні тканини та формують метастатичний центр [10, 11]. На сьогодні вже показано здатність первинної пухлини через низку факторів «готувати» так звані метастатичні ніші для осідання дисемінованих ПК (ДПК), тобто створювати відповідне мікрооточення у місцях віддаленого метастазування. Таке мікрооточення формується, зокрема, шляхом індукування експресії ММП у передметастатичних сайтах, яке, вірогідно, відбувається ще до осідання ДПК [12–14]. Отримані результати дозволяють припустити, що визначення аномальних зразків експресії ММП у нормальних тканинах може означати наявність віддалених клінічно незначених метастазів або навіть їхню вірогідну появу в недалекому майбутньому, а також стати частиною діагностичних технологій і терапевтичних схем. Вважають доведеною (на нокаутуваних мишах) функціональну роль ММП-9 у створенні ніш у місцях віддаленого метастазування. Зокрема, у модельних дослідах показано, що ММП-9 індукувалася у віддалених від пухлини тканинах, випереджаючи метастазування, та була локалізована не лише в ендотеліальних клітинах легень, а і в макрофагах [15]. Клінічні дослідження останніх років також спрямовані на застосування ММП як маркерів прогнозування захворювання. Так, експресія МТ1-ММП у кістковому мозку (КМ) хворих на рак шлунка (РШ) асоційована з віддаленим метастазуванням і перитонеальною дисемінацією ПК [16].

Визначено, що дисемінація ПК може відбуватися на будь-якій стадії пухлинної прогресії, а ДПК можуть осідати у КМ, лімфатичних вузлах, циркулювати у крові хворих на рак і бути при цьому в нестій-

кому «дрімотному» стані [17]. Одним із механізмів, що регулюють «дрімоту» пухлини, є взаємодія ДПК із мікрооточенням, що впливає на експресію генів і клітинну життєдіяльність. Властивості ПК у комплексі з властивостями навколишнього середовища можуть бути тригером їхнього «дрімотного» стану та виходу з нього.

Наразі головний результат досліджень ММП полягає в тому, що вони можуть бути застосовані для запобігання реалізації кожного із кроків метастатичного каскаду, коли будуть розроблені адекватні методи інгібіції міжклітинного протеолізу. Більшість дослідників вважають, що формування метастазів може бути зменшене завдяки адресній дії інгібіторів протеаз. Так, показана можливість інгібування ММП-14, гемопексиновий фрагмент якої вступає у взаємодію з молекулою адгезії CD44, результатом чого є зниження міграції ПК [18]. Отримано позитивні результати із застосування інгібіторів з метою збільшення тривалості життя, скорочення темпів прогресування та росту пухлини. Тепер увагу дослідників протеаз і деградації матриксу зосереджено на запобіганні метастазуванню. Інший перспективний напрям досліджень у цій галузі — можливість використання ММП як діагностичного та прогностичного біомаркера [14, 19].

З огляду на вищезазначене метою роботи було: дослідити зв'язки між концентраціями активних форм желатиназ (ММП-2 та -9) у пухлині та КМ і деякими іншими факторами мікрооточення при РШ; виявити зв'язок між рівнями активності желатиназ у КМ хворих на РШ і стадіями захворювання, рівнем метастазування, наявністю ДПК у КМ; визначити залежності між показниками активності желатиназ і тривалістю життя хворих, а також можливість їх використання для прогнозу перебігу РШ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено зразки пухлинної тканини (післяопераційний матеріал) та КМ 282 хворих на первинний РШ, що перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі МОЗ України з 2005 по 2014 р. (174 чоловіки, 108 жінок), яких розподілили за стадіями захворювання таким чином: 48 осіб — I, 80 — II, 85 — III та 69 — IV стадія захворювання. Хворі не отримували передопераційної терапії. Пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу з дослідницькою метою.

За гістологічною структурою більшість досліджуваних пухлин становлять аденокарциноми (60%) та недиференційований рак (30%), за ступенем диференціації — G₃ (45%), за локалізацією — пухлини нижньої третини шлунка (50%). Розподіл обстежених пацієнток за стадіями захворювання був майже рівномірним: II, III та IV — 29; 30 та 24% відповідно, дещо меншою є група хворих зі стадією I (17%). Серед хворих переважають пацієнти з категоріями

T_3 (56%) та M_0 (88%), за показником N_0 та N_{1-2} розподіл рівномірний (48 та 52% відповідно).

В отриманих зразках пухлинної тканини визначали активність ММП-2 та -9 методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину як субстрата) на основі SDS-електрофорезу білків [20]. Після відмивання гелю активні форми ММП-2 та -9 візуалізувалися у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, локалізація яких визначалася за стандартами молекулярної маси («Sigma») і відповідала молекулярній масі кожного з ферментів (72 та 92 кДа відповідно). Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом вимірювання площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 і -9 («Sigma»). За умовну одиницю (у.о.) прийнято активність 1 мкг ферменту в 1 г вихідного контрольного зразка. Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

Імуногістохімічне визначення $CD8^+$ і $CD45RO^+$ Т клітин, $CD34^+$, $CD68^+$, Flt^+ та $CXCR4^+$ клітин проведено на парафінових зрізах тканини РШ із використанням специфічних мишачих МкАТ: cloneC8/144B (ready-to-use, DakoCytomation, Данія), cloneUCHL1 (1:400) (Sigma, США), cloneQVEnd 10 (1:100), clonePG-M1 (1:80); специфічних кролячих МкАТ: cloneSC-316 (1:50) (SantaCruzBiotechnology, Inc., США) та clone AB2074 (Abcam, Великобританія) відповідно. Імунореакції визначено і візуалізовано за допомогою полімер-пероксидазного методу (EnVision+/HRP та 3,3-diaminobenzidin, DakoCytomation, Данія) із подальшим забарвленням гематоксиліном Майєра. Як негативний контроль використовували PBS для заміни первинних антитіл. CD-позитивні клітини були підраховані на 1000 клітин на кожному зрізі при збільшенні $\times 400$, кількість CD^+ -клітин виражали у вигляді відсотків. Якщо в пухлині виявляли більше ніж 10% імунореактивних клітин, то такі зразки вважали «позитивними». Щільність мікросудин (ЩМС) $CD34^+$ визначали, підраховуючи кількість мікросудин на 1 мм².

Виявлення цитокератин-позитивних клітин (panCK⁺) серед мононуклеарів КМ на цитоспінових препаратах [1], фіксованих в ацетоні, здійснювали, використовуючи метод АРААР (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) та систему візуалізації EnVision™ G/2 System/AP Rabbit/Mouse (PermanentRed) (DakoCytomation, Данія) з подальшим забарвленням розчином метилового зеленого (Methyl Green histological staining reagent, ready-to-use, DakoCytomation, Данія). Як первинні антитіла використовували МкАТ миші проти panCK (clone AE1/AE3, DakoCytomation, Данія). Як негативний контроль застосовували неспецифічний мишачий IgG1 (MOPC-21, Sigma, США). Для визначення кількості panCK⁺ клітин у КМ цитоспінові препарати досліджували візуально за допомогою світлового мікроскопа при збільшенні $\times 1000$. Кількість ПК підраховували, виходячи із загальної кількості монону-

клеарів на всіх отриманих цитоспінових препаратах для кожного зразка, і виражали на 10⁶ мононуклеарних клітин. За наявності хоча б однієї ПК на 10⁶ мононуклеарів КМ хворого вважали «позитивним».

Проводили статистичну обробку даних з 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 Спірмана (*rho*). Загальну виживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейєра, вірогідність розбіжностей між кривими виживаності визначали за допомогою log-rank тесту. Статистична значущість прийнята при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Однією з найбільш характерних ознак злоякісного новоутворення, що сприяє пухлинній прогресії, є гіпоксія [21]. Натепер в експериментальних дослідженнях і на клінічному матеріалі показано зв'язок між кількістю ДПК у КМ та окремими гіпоксія-залежними показниками в пухлинній тканині [22, 23]. Серед білків, які активуються за умов гіпоксії, важлива роль у пухлинній прогресії належить ММП-2 та -9 (або желатиназам А і В відповідно) [24–26]. Раніше в наших дослідженнях на мишах з карциномою легені Льюїс було показано, що зростання рівня пухлинної гіпоксії супроводжується збільшенням активності желатиназ у пухлині та посиленням метастазування [27]. Також у попередніх роботах нами вивчено асоційованість желатиназ із гіпоксією пухлини у хворих на РШ [28, 29]. Так, для пухлин із задовільною оксигенацією характерні низькі показники сумарної активності ММП, при зростанні рівня гіпоксії ці показники підвищуються в середньому у 4,5 раза ($p < 0,05$). 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 ЩМС ($r = 0,46$; $p < 0,05$), з іншого. Результати свідчать про гіпоксія-регульований характер активації ММП-2 та -9 у тканині РШ [28].

Пухлиноасоційовані макрофаги (ПАМ) є важливим гіпоксія-залежним фактором мікрооточення пухлини та продуцентами ММП. Виявлено пряму позитивну кореляцію між кількістю ПАМ і концентраціями активних форм ММП-2 ($r = 0,4$; $p < 0,05$) та -9 ($r = 0,5$; $p < 0,05$) у тканині РШ. Показано також, що хворі на РШ, що мали малу кількість $CD68^+$ клітин ($< 23\%$) та активність ММП-2 ($< 2,0$ мкг/г тканини) і ММП-9 ($< 4,5$ мкг/г тканини), живуть достовірно довше та мають нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж пацієнти із відповідно вищими показниками [29]. Отримані результати демонструють взаємозалежність між показниками активності ММП-2, -9 і кількістю $CD68^+$ клітин у пухлині та можуть бути використані в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ [29].

Відомо, що за умов специфічного метаболічного мікрооточення пухлини клітини запалення (і серед них макрофаги) змінюють свої протипухлинні функції на пропухлинні та беруть активну участь у пухлинній прогресії, зокрема як найважливіше джерело желатинази у пухлині [29]. З іншого боку, ММП, продукція яких контролюється ПАМ, самі регулюють процеси запалення. ММП полегшують рекрутування запальних клітин шляхом розщеплення медіаторів запалення. Деякі хемокіни, зокрема CCL7 та CXCL12, є субстратами для ММП-2, а ММП-9 розщеплює та активує CXCL6 і CXCL8, інактивуючи при цьому CXCL1 і CXCL4 [30]. Таким чином, желатинази не лише продукуються клітинами запалення, але й водночас є регуляторами запальних процесів. Тобто, ММП як фактор мікрооточення ПК сприяють розповсюдженню пухлини не лише безпосередньо через протеолітичну деградацію ЕЦМ, але значною мірою опосередковано — через вплив на інші фактори. Отже, ММП в якості сигнальних молекул беруть участь у формуванні стромального мікрооточення ПК.

З огляду на це нами досліджено залежність між рівнями активності желатиназ і кількістю пухлиноінфільтруючих лімфоцитів (ПЛ) ($CD8^+$ та $CD45RO^+$ клітин) у пухлинній тканині хворих на РШ. Цитотоксичні ПЛ ($CD8^+$ Т лімфоцити) — фактори специфічного клітинного адаптивного імунітету, які атакують ПК і презентують на своїй поверхні пухлиноасоційовані антигени в комплексі з пептидами головного комплексу гістосумісності I класу [31]. $CD8^+$ клітини продукують інтерферон-гамма, який діє на пухлинні мішені. $CD45RO^+$ лімфоцити також ідентифіковані як протипухлинні ефектори, і є, крім того, клітинами пам'яті [31]. У нашому дослідженні показано, що активність ММП-2 (желатинази А) зворотно корелює із кількістю $CD8^+$ клітин ($r = -0,3; p = 0,039$) та $CD45RO^+$ клітин ($r = -0,33; p = 0,031$) у пухлинній тканині (рис. 1, 2).

Відомо, що кількість $CD8^+$ та $CD45RO^+$ лімфоцитів у тканині РШ корелює з наявністю метастазів у лімфатичних вузлах, але не з глибиною пухлинної інвазії; прогностична роль лімфоцитів, які інфільтрують пухлину, стосується головним чином зниження метастатичного потенціалу. З іншого боку, нами продемонстровано, що висока виживаність хворих на РШ асоційована з низькими показниками активності ММП-2. Наведені вище дані дозволяють припустити, що ПЛ (зокрема $CD8^+$ та $CD45RO^+$ клітини), можливо, контролюють метастазування через активацію ММП-2. Такий контроль, ймовірно, може відбуватися шляхом протеолітичного ремодулювання рецепторів ПЛ і ПК. Так, показано, що ММП-2 здійснює протеолітичну деградацію рецептора інтерферону типу I (IFNAR1), експресованого $CD8^+$ Т клітинами. Є відомості, що ММП-2 регулює $CD8^+$ Т клітини саме через вплив на рецептори, задіяні у продукції цитокінів та інтерлейкінів [32].

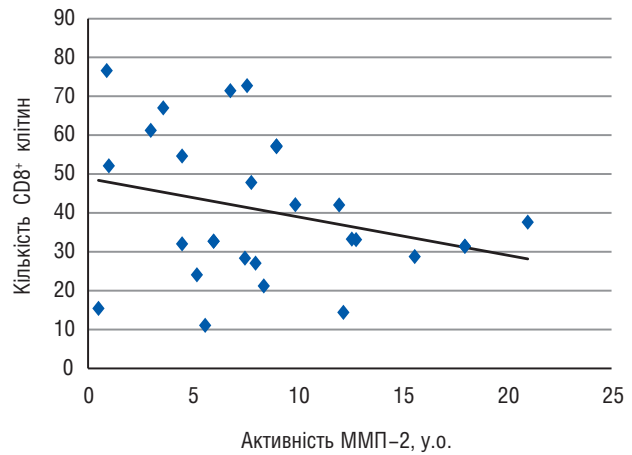


Рис. 1. Залежність між активністю ММП-2 та кількістю $CD8^+$ клітин у тканині РШ ($p < 0,05$)

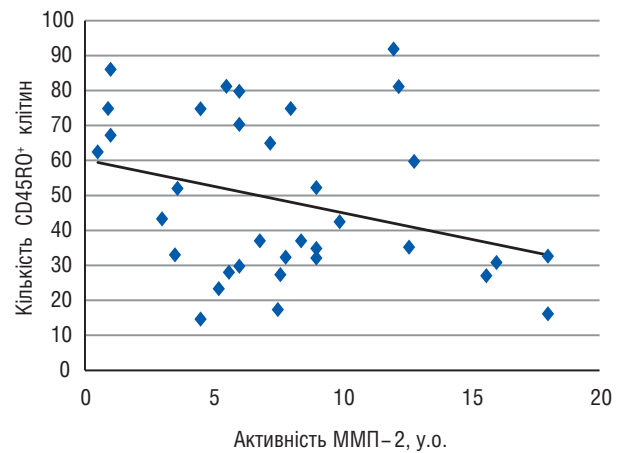


Рис. 2. Залежність між активністю ММП-2 та кількістю $CD45RO^+$ клітин у тканині РШ ($p < 0,05$)

CXCR4 (хемокіновий рецептор типу 4) — трансмембранний білок родини рецепторів хемокінів. Відомо, що експресія CXCR4 у ПК сприяє «хомінг-ефекту» у КМ [33]. Нами показано наявність позитивної кореляції між рівнями активності ММП-2 і -9 та експресії CXCR4 у тканині РШ ($r = 0,3; p = 0,028$ та $r = 0,41; p = 0,038$ відповідно) (рис. 3, 4). Відомо, що ММП шляхом протеолітичного ремодулювання можуть як інгібувати [32], так і активувати рецептори, наприклад рецептори VEGF [34–38]. Можливо, зв'язок між желатиназами та CXCR4 зумовлений саме ремодулювальним активуючим впливом цих ферментів на рецептор.

Таким чином, фактори мікрооточення пухлини не є відокремленими, а динамічно пов'язані між собою. Крім того, пухлина через низку сигнальних шляхів формує сприятливе для ПК мікрооточення в місцях віддаленого метастазування [1–8]. Виходячи з цього, нами досліджено зв'язки між деякими гіпоксія-асоційованими показниками в пухлині та рівнями активності желатиназ у КМ хворих на РШ. Показано існування прямих позитивних залежностей між експресією низки гіпоксія-асоційованих білків HIF-1, CD34 (показником ЩМС), Flt (рецептором VEGF) у пухлинах та активністю ММП-2 і -9 у КМ хворих на РШ

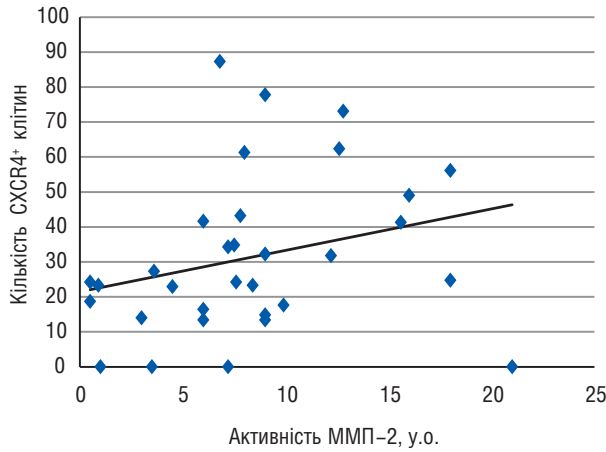


Рис. 3. Залежність між активністю ММП-2 і кількістю CXCR4+ клітин у тканині РШ.

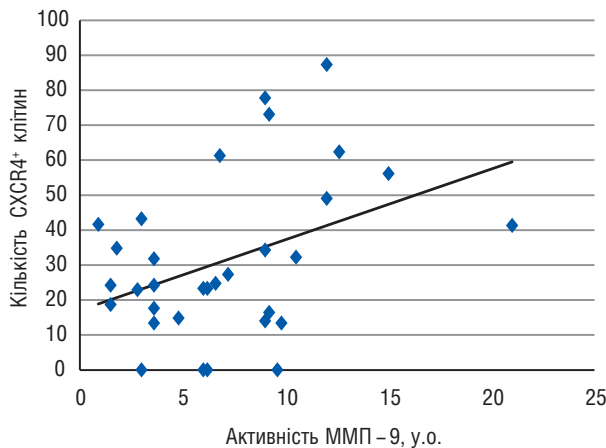


Рис. 4. Залежність між активністю ММП-9 і кількістю CXCR4+ клітин у тканині РШ.

(коефіцієнти кореляції 0,3–0,51) (табл. 1), що вказує на гіпоксичну природу механізмів активації латентних форм ферментів і співвідноситься із раніше отриманими нами даними про їхню асоційованість із гіпоксією [28]. Так, активність обох желатиназ корелює з рівнем експресії HIF-1 α , що підтверджує його сигнальну роль в активації ММП-2 та -9 у місцях віддаленого метастазування. Виявлено, що рівні активних форм ММП-9 у КМ корелюють із показником ЩМС у пухлинній тканині (коефіцієнт кореляції 0,51). При цьому раніше ми продемонстрували залежність між експресією CD34 та активністю ММП-9 у пухлинній тканині, що співвідноситься з її важливою роллю в неангіогенезі [28]. Та найважливіше, що визначені зв'язки між гіпоксія-залежними показниками в пухлині та активністю ММП підтверджують тезу про формування пухлиною сприятливого для ДПК мікрооточення у місцях віддаленого метастазування, зокрема пухлинозалежну активацію желатиназ у КМ хворих на РШ.

Таблиця 1

Коефіцієнти кореляцій між активністю желатиназ у КМ та деякими гіпоксія-асоційованими показниками у тканині РШ ($p < 0,05$)

Експресія у тканині РШ	Активність ММП-2	Активність ММП-9
HIF-1 α	0,38	0,30
CD34 (ЩМС)	–	0,51
Flt	–	0,32

Раніше в модельних експериментах на щурах із карциномою Герена нами показано участь первинної пухлини в активації желатиназ у КМ тварин [39]. Активність желатиназ реєстрували у КМ як інтактних, так і тварин з пухлиною, але в останніх — на значно вищому рівні, що, вочевидь, свідчить про активацію ферментів у КМ, яка відбувається в організмі тварин під впливом пухлини. Упродовж контактної інкубації *in vitro* з пухлиною клітин КМ тварин із карциномою Герена, протеолітичний потенціал якого частково вже реалізований, відбувається подальша незначна активація желатиназ. У клітинах інтактного КМ у результаті первинного контакту з пухлиною концентрації активних форм ММП-2 та -9 суттєво зростають (у 14 і 5 разів відповідно). Водночас активність ферментів у пухлинній тканині значно зменшується, тобто відбувається своєрідне «перенесення» активності желатиназ від пухлини до віддаленої тканини метастазування — КМ. Таким чином, первинна пухлина може формувати відповідні сприятливі умови (так звані ніші) для осідання ДПК, виходу їх із «дрімотного» стану та формування метастатичних центрів у віддалених органах і тканинах [12–14].

ММП, зокрема желатинази, є важливим фактором мікрооточення як первинної пухлини, так місць віддаленого метастазування, де їх активність є однією з умов розвитку метастазів. З огляду на це нами досліджено рівні активності желатиназ у КМ у зв'язку з клініко-патологічними характеристиками хворих на РШ. Важливо відмітити, що активність желатиназ виявлено у КМ у всіх обстежених хворих на РШ, включаючи тих, у кого не зафіксовано ДПК у КМ. Можливо, ще за відсутності ДПК у передметастатичних сайтах відбувається формування нового мікрооточення. Привертає увагу той факт, що активність ММП-2 дещо знижується на II стадії РШ, надалі зростає та сягає максимальних значень на IV стадії. Активність ММП-9, навпаки, досягає найвищих значень саме у пацієнтів із РШ II стадії, а при РШ IV стадії — знижується (рис. 5). Можливо, тут желатинази функціонально доповнюють одна одну залежно від стадії розвитку пухлинного процесу.

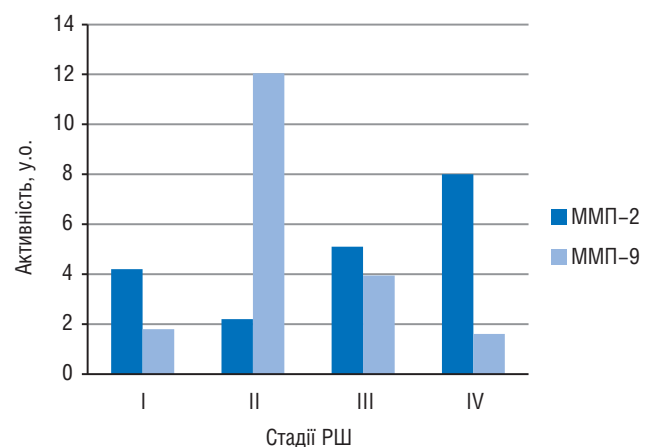


Рис. 5. Рівні активності ММП-2 та -9 у КМ хворих на РШ за стадіями (для ММП-2 та -9: II–IV — $p < 0,05$)

Рівні активності желатиназ КМ хворих на РШ не корелюють з показниками як метастазування у лімфатичні вузли, так і віддаленого метастазування — дані табл. 2, 3 свідчать, що різниця між групами незначна і недостовірна ($p > 0,05$).

Таблиця 2

Активність желатиназ у КМ і метастазування у лімфатичні вузли хворих на РШ

Показник активності	N_0	N_{1-4}
ММП-2, у.о.	$5,1 \pm 4,2$	$6,6 \pm 5,3$
ММП-9, у.о.	$4,4 \pm 4,1$	$5,3 \pm 3,5$

$p > 0,05$.

Таблиця 3

Активність желатиназ у КМ і віддалене метастазування у хворих на РШ

Показник активності	M_0	M_{1-2}
ММП-2, у.о.	$6,2 \pm 3,7$	$6,7 \pm 3,3$
ММП-9, у.о.	$5,0 \pm 4,3$	$5,9 \pm 4,0$

$p > 0,05$.

На противагу вищенаведеним даним виявлено зв'язок між рівнями активності желатиназ і наявністю ДПК у КМ хворих на РШ (табл. 4).

Таблиця 4

Активність ММП-2, -9 та ДПК у КМ хворих на РШ

Показник активності	ДПК+ КМ	ДПК- КМ
Усі хворі (n = 86)		
ММП-2, у.о.	$8,79 \pm 4,03$	$2,83 \pm 1,34^*$
ММП-9, у.о.	$7,61 \pm 3,75$	$2,44 \pm 1,66$
Хворі на РШ M_0 (n = 68)		
ММП-2, у.о.	$8,60 \pm 4,01$	$2,79 \pm 1,39^*$
ММП-9, у.о.	$7,49 \pm 3,4$	$2,58 \pm 1,85$

* $p < 0,05$.

У всіх досліджених пацієнтів, а також (що особливо важливо) для тих, у кого клінічно не виявлено віддалених метастазів (категорія M_0), такий зв'язок достовірно підтверджений для ММП-2, активність якої в КМ із відсутніми ДПК була майже в 3 рази нижчою за активність у КМ з наявними ДПК. Щодо ММП-9, то зв'язок між рівнями її активності з наявністю ДПК у КМ виявлено на рівні тенденції — активність ММП-9 у КМ з відсутніми ДПК у 2,5 рази нижча за таку в КМ із наявними ДПК, але різниця недостовірна. Таким чином, ММП-2 є фактором мікрооточення, що сприяє осіданню ДПК у місцях віддаленого метастазування.

З урахуванням цього визначено загальну виживаність хворих на РШ залежно від активності желатиназ у КМ. Пацієнти, які не проходили післяопераційну терапію, з активністю ММП-2 у КМ $< 2,8$ у.о. живуть достовірно довше, ніж з вищою активністю (рис. 6). Пацієнти з активністю ММП-9 у КМ $< 3,0$ у.о. живуть довше, ніж з вищою активністю, хоча різниця недостовірна (рис. 7).

Вважають, що желатинази можуть бути одним із факторів віддаленого мікрооточення, які контролюють (прямо чи опосередковано) перебування ДПК у «сплячому» стані та вихід із нього. Виходячи з цього, досліджено загальну 3-річну виживаність хворих залежно від активності желатиназ у КМ та за наявності або відсутності ДПК у КМ (табл. 5). І за відсутності, і за наявності ДПК у групах із нижчими показниками активності ММП-2 відзначено кращу загальну виживаність, ніж у групах із вищи-

ми показниками (в 2 та 4 рази відповідно). Вірогідно, у першому випадку ММП-2 контролює дисемінацію, а в другому — вихід ДПК зі «сплячого» стану. Таким чином, ММП-2 у перспективі може бути фактором формування віддалених мікрометастазів і перебігу мінімальної залишкової хвороби.

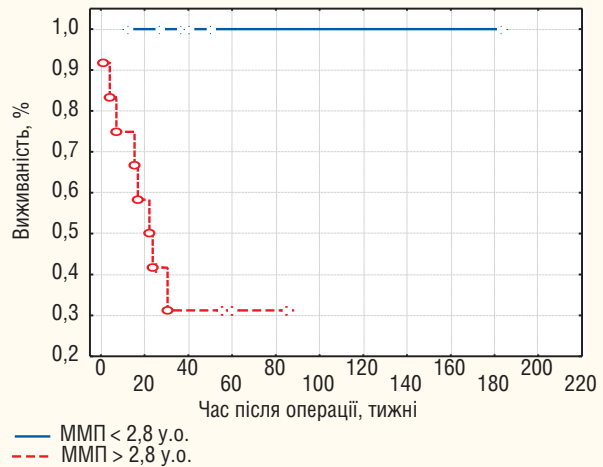


Рис. 6. Загальна виживаність хворих на РШ залежно від активності ММП-2 у КМ (без хіміотерапії); $p = 0,016$

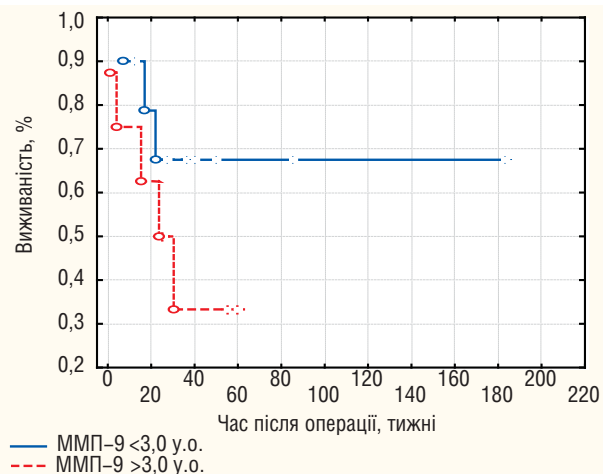


Рис. 7. Загальна виживаність хворих на РШ залежно від активності ММП-9 у КМ (без хіміотерапії); $p = 0,218$

Таблиця 5

3-річна загальна виживаність хворих (%) на РШ залежно від активності ММП-2 та відсутності або наявності ДПК у КМ

Активність ММП-2 у КМ, у.о.	ДПК- КМ	ДПК+ КМ
$< 3,6$	82%*	—
$> 3,6$	37%	—
$< 4,8$	—	62%*
$> 4,8$	—	15%

* $p < 0,05$.

ВИСНОВКИ

1. ММП-2 та -9 є гіпоксія-асоційованими факторами мікрооточення в пухлинній тканині РШ.
2. Желатинази беруть участь у формуванні мікрооточення пухлини та КМ хворих на РШ.
3. ММП-2 у КМ хворих на РШ асоційована з дисемінацією ПК і є маркером мінімальної залишкової хвороби.
4. Результат визначення активності ММП-2 та -9 у КМ може бути використано для прогнозу перебігу РШ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Muller MM, Fusenig NE. Friends or foes — bipolar effects of the tumourstroma in cancer. *Nature Reviews* 2004; **4**: 839–49.
2. Koelink PJ, Sier CFM, Hommes DW, *et al.* Clinical significance of stromal apoptosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; **101**: 765–73.
3. Чехун ВФ. Строма — регулятор прогрессии опухолевых клеток. *Онкология* 2009; **11** (3): 164–5.
4. Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, *et al.* Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB* 2005; **19**: 234–7.
5. Montel V, Mose ES, Tarin D. Tumor-stromal interaction reciprocally modulate gene expression patterns during carcinogenesis and metastasis. *Int J Cancer* 2006; **119**: 251–63.
6. Kassenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; **141**: 52–67.
7. Noel A, Gutierrez-Fernandez A, Sounni NE, *et al.* New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol* 2012; **3**: 1–9.
8. Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis* 2008; **25**: 593–600.
9. Ганусевич ИИ. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. *Онкология* 2010; **12** (2): 108–17.
10. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 448–56.
11. Geho DH, Bandle RW, Claire T, Liotta LA. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology* (Bethesda) 2005; **20**: 194–200.
12. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the «soil»: the pre-metastatic niche. *Cancer Res* 2006; **66**: 11089–93.
13. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; **438**: 820–7.
14. Papaspiridonos M, Lyden D, Kaplan RN. Exploring the earliest steps in metastasis: The premetastatic niche. In: *Cancer Metastasis: Biologic Basis and Therapeutics*, Cambridge, 2011: 199–203.
15. Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer* 2010; **46**: 1181–8.
16. Mimori K, Fukagawa T, Kosaka Y, *et al.* A large-scale study of MT1-MMP as a marker for isolated tumor cells in peripheral blood and bone marrow in gastric cancer cases. *An Surg Oncol* 2008; **15**(10): 2934–42.
17. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; **103**: 481–90.
18. Zarrabi K, Dufour A, Li J, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14)-mediated. *Cancer Cell Migration* 2011; **286**: 33167–77.
19. Aboukhatwa E. Protease enzymes and cancer metastasis. *Breast Cancer* 2011; **6**(1): 6–8.
20. DeClerk 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.
21. Hoekel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**: 266–76.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. McCormick ML, Gavril D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **28**(4): 1432–8.
26. 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.
27. 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.
28. Ганусевич П, Гуменюк ЛД, Ковельська АВ та ін. Зв'язок матриксних металлопротеїназ-2 та -9 із регіонарним і віддаленим метастазуванням раку шлунка людини. *Онкологія* 2014; **16** (1): 40–6.
29. Ганусевич П, Гуменюк ЛД, Мамонтова ЛА та ін. Пухлиноасоційовані макрофаги та вміст активних форм желатиназ у тканині раку шлунка: зв'язок з виживаністю хворих. *Онкологія* 2013; **15** (3): 14–9.
30. Marconi C, Bianchini F, Mannini A, *et al.* Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2008; **25**: 225–31.
31. Osinsky S, Kovelskaya A, Bubnovskaya L, *et al.* CD8 and CD45RO T lymphocytes in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with disseminated tumor cells and disease outcome. *Exp Oncol* 2015; **37** (1): 48–52.
32. Gallois A, Godefroy E, Manches O, Bhardwaj N. Effect of matrix metalloproteinase-2 on CD8+ T cell and NK cell responses. *J Clin Oncol*, 2012 ASCO Annual Meeting Abstr; **30** (15): 21081.
33. Osinsky D, Kovelskaya A, Bubnovskaya L, *et al.* CXCR4 expression in gastric cancer and bonemarrow: association with hypoxia-regulated indices, disseminated tumor cells, and patients survival. Hindawi Publishing Corporation *J Cancer Res Volume* 2015, Article ID 980214, 8 p. (<http://dx.doi.org/10.1155/2015/980214>).
34. Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta (BBA) — Molecular Cell Research* 2010; **1803** (1): 103–20.
35. Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, *et al.* Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia* 2008; **10**: 329–40.
36. Jodele S, Chantrain CF, Blavier L, *et al.* The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma is matrix metalloproteinase-9 dependent. *Cancer Res* 2005; **65**: 3200–8.
37. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multi-stage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 12493–8.
38. Du R, Lu KV, Petritsch C, *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008; **13**: 206–20.
39. Бурлака АП, Ганусевич П, Лукін СМ та ін. Редокс-залежні механізми взаємодії пухлини з кістковим мозком. *Онкологія* 2013; **15** (3): 197–203.

MATRIX METALLOPROTEINASES AS TUMOR STROMA MICROENVIRONMENT FACTORS: THE ROLE IN COURSE OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN GASTRIC CANCER

I.I. Ganusevich, L.A. Mamontova, A.V. Kovelska, L.D. Gumenyuk, S.P. Merentsev, S.P. Osinsky

Summary. Matrix metalloproteinases (MMPs) are activated in hypoxia conditions, and are tumor cells microenvironment factor in primary tumor and in a distinct

sites of metastasis, and provide dissemination of tumor cells. Today special interest of oncologists are focused on the study of MMPs as triggers of escape of disseminated tumor cells (DTC) from dormancy in minimal residual disease (MRD). **Aim:** To investigate the relationship between levels of gelatinases activity in tumor and in bone marrow (BM) and some hypoxia-associated factors of microenvironment in gastric cancer (GC); to establish links between levels of gelatinases activity in BM in patients with GC and stages of disease, level of metastasis, presence of DTC in BM; to examine relationship between levels of gelatinases activity in BM and patients life duration, possibility of its use for prognosis course of MRD in GC. **Methods:** We analyzed data from 282 patients with GC (174 — men, 108 — women), that were distributed in stages of the disease in next way 48 — I, 80 — II, 85 — III and 69 — IV stage. We used zymography in polyacrylamide gel, immunohistochemical, immunocytochemical methods. In the statistical analysis used Student's *t*-test, correlation analysis, Kaplan — Meier survival analysis. **Results:** It was found the correlation between activity of MMP-2 and -9 in BM of patients with GC, on the one hand, and the expression of hypoxia-associated proteins HIF-1, CD34 (microvessel density) and FLT (VEGF receptor) in tumors, on the other hand ($r = 0,30-0,51, p < 0.05$). Levels of gelatinases activity in BM of patients with GC do not correlate with indicators of metastasis neither in the lymph nodes (LN) nor in distinct one ($p > 0.05$). For all studied patients and for those of them who have not clinical-

ly detected distant metastases (category M_0), relationship with DTC were significantly detected for MMP-2, which activity in the BM without DTC was almost in 3 times lower than in BM with DTC. Patients who did not receive postoperative therapy with MMP-2 activity in BM < 2.8 a.u. live significantly longer than those who have higher activity ($p = 0.016$). Patients with MMP-9 activity in BM < 3 a.u., live longer than those who have higher activity, although the difference is not significant ($p = 0.218$). However, neither in absence nor in presence of DTC in the BM, the best three-year overall survival was observed in groups with levels of MMP-2 activity lower than the 3.6 and 4.8 a.u., respectively. Apparently, in the first case MMP-2 controls dissemination, in the second — escape of DTC from dormancy. **Conclusions:** Gelatinases in BM are microenvironment hypoxia-associated factors in GC; MMP-2 in BM of patients with GC are associated with dissemination of tumor cells and are marker of MRD; MMP-2 and -9 in BM can be used to control course of disease in patients with GC.

Key Words: matrix metalloproteinases, tumor microenvironment, minimal residual disease, gastric cancer.

Адреса для листування:

Ганусевич І.І.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

Одержано: 09.09.2015