

Л.М. Бубновська<sup>1</sup>  
В.М. Михайленко<sup>1</sup>  
С.П. Меренцев<sup>2</sup>  
В.В. Трачевський<sup>3</sup>  
І.І. Ганусевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

<sup>2</sup>Київський міський клінічний онкологічний центр

<sup>3</sup>Технічний центр НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак шлунка, гіпоксія, дисеміновані пухлинні клітини, фосфоліпід, лізофосфатидилхолін.

## КОНЦЕНТРАЦІЯ ФОСФОЛІПІДІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА, РІВЕНЬ ГІПОКСІЇ ПЕРВИННОЇ ПУХЛИНИ: АНАЛІЗ МОЖЛИВОГО ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ З МІНІМАЛЬНОЮ ЗАЛИШКОВОЮ ХВОРОБОЮ

**Мета:** виявити асоціацію між змінами концентрації фосфоліпідів у сироватці крові хворих на рак шлунка (РШ), рівнем гіпоксії в первинній пухлині і наявністю дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) у кістковому мозку (КМ). **Об'єкт і методи:** загалом обстежено 67 хворих на первинний РШ в Київському міському клінічному онкологічному центрі. Рівень гіпоксії у пухлині, а також концентрації фосфоліпідів у сироватці крові оцінювали за допомогою <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопії. ДПК у КМ виявляли імуноцитохімічним методом. **Результати:** встановлено, що за умов знижених концентрацій лізофосфатидилхоліну (lysophosphatidylcholine (LPC) <0,160 ммоль/л) у сироватці крові хворих вірогідність появи ДПК у КМ зростає в 6,99 раза (odds ratio 6,99; 95% довірчий інтервал 1,586–25,508;  $\chi^2 = 8,118$ ;  $p < 0,01$ ); ДПК в КМ виявляли в 81,8% хворих ( $p < 0,01$ ) у разі, коли первинна пухлина знаходилася в умовах сильної та середньої гіпоксії. **Висновки:** показано, що існує взаємозв'язок змін концентрації LPC у сироватці крові хворих із мінімальною залишковою хворобою, а саме, зниження рівнів LPC асоціюється з наявністю ДПК у КМ хворих ( $p < 0,01$ ), і ця асоціація посилюється за умов гіпоксії в первинній пухлині ( $p < 0,01$ ). Отримані дані дають підставу розглядати зміни концентрації LPC у сироватці крові, а саме її зниження, як можливий біомаркер пухлинної прогресії, який може бути важливим для моніторингу клінічного перебігу захворювання і прогностичним фактором ризику виникнення рецидиву хвороби, що має особливе значення за умов індивідуалізації терапії.

### ВСТУП

Результати лікування хворих на рак шлунка (РШ) залишаються незадовільними. Віддалені метастази є ключовим фактором, який впливає на прогноз. Відомо, що навіть радикальна операція не може гарантувати позитивні віддалені результати, які залежать від ранньої дисемінації пухлинних клітин (ПК) ще до оперативного втручання [1, 2].

Дисеміновані пухлинні клітини (ДПК), як і циркулюючі ПК у периферичній крові, належать до категорії так званої мінімальної залишкової хвороби. Мінімальна залишкова хвороба означає присутність ПК, котрі не можуть бути виявлені на основі застосування рутинних діагностичних методів [3]. Однією з причин виходу клітин із первинного вогнища є несприятливі умови мікрооточення, зокрема гіпоксія і нестача поживних речовин. Циркулюючі ПК після виходу з пухлинного вузла залишаються головним чином у кістковому мозку (КМ), що забезпечує їм сприятливі умови існування, і зберігають потенціал до перетворення у метастази. Перебування ПК у латентному стані, часто протягом тривалого

часу, є однією з найактуальніших проблем клінічної онкології [4]. Тому виявлення ДПК у КМ набуває важливого значення в оцінці ризику раннього метастазування і прогнозуванні перебігу захворювання.

Особливе місце у пухлинному мікрооточенні, яке відіграє ключову роль у рості пухлини, посідає внутрішньопухлинна гіпоксія [5]. У багатьох експериментальних та клінічних дослідженнях чітко доведено, що гіпоксія індукуює експресію цілої низки сигнальних шляхів, які забезпечують виживання ПК за умов несприятливого мікрооточення, зокрема нестачі кисню, та злякисну прогресію і метастазування у віддалені органи [6, 7]. Зроблено також припущення, що гіпоксія-асоційований профіль пухлини з його багатьма сигнальними шляхами і факторами регулює й контролює ріст пухлини та її прогресію [8, 9].

Дані, насамперед клінічні, щодо зв'язку між рівнем гіпоксії первинної пухлини та наявністю ДПК у КМ у доступній літературі практично відсутні. Водночас виявлено асоціацію між наявністю ДПК у КМ та рівнем гіпоксії у первинній пухлині хворих на РШ [10].

Доведено, що, як зміни в сигнальних шляхах, так і знижений рівень оксигенації в пухлинній тканині (гіпоксія), роблять свій внесок у підвищення рівня фосфоліпідів (ФЛ) у пухлині [11]. Пухлина, в свою чергу, впливає на системний метаболізм ФЛ, що позначається на їх концентрації в крові та КМ. Посилена проліферація ПК веде до збільшеного споживання ФЛ, ніж це потрібно нормальній клітині. Це узгоджується з біохімічними змінами в сироватці крові пацієнтів зі злоякісними захворюваннями і зменшенням як рівня окремих ФЛ, так і загальної їх кількості у хворих.

Визначення концентрації ФЛ у сироватці крові та рівня гіпоксії в пухлинній тканині стало можливим завдяки застосуванню методу  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії. Аналіз  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрів ФЛ визначає ліпідний і фосфоліпідний профіль у тканинах, клітинах, сироватці та плазмі периферичної крові. Також перспективними є роботи з визначення змін фосфоліпідного складу мембран мононуклеарів як периферичної крові, так і КМ [12].

Моніторинг змін фосфоліпідного метаболізму, вивчення модуляції сигналів ФЛ на  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрах, оцінка значення цих резонансів можуть бути важливими не тільки в діагностичних цілях, але й як контроль за ефективністю впровадженої індивідуальної терапії хворих, а також у прогнозуванні прогресування перебігу захворювання [12, 13].

У низці досліджень були виявлені системні зміни ФЛ в плазмі, сироватці периферичної крові у хворих на рак щитоподібної залози [14], нирки [15], товстої кишки [16], молочної залози [17], а також у пацієнтів зі злоякісними захворюваннями системи крові (гостра лейкемія, множинна мієлома, лімфома) [18, 19] і показана можливість прогнозу перебігу захворювання та моніторингу терапії [12, 20].

Нашими попередніми дослідженнями встановлено зниження рівня ФЛ у сироватці периферичної крові у хворих на РШ порівняно з практично здоровими людьми-донорами і продемонстрована важливість застосування визначення концентрації ФЛ у клінічній практиці [21].

Метою цього дослідження було виявити, чи існує певна асоціація між змінами концентрації ФЛ у сироватці крові хворих на РШ, рівнем гіпоксії в первинній пухлині та наявністю ДПК у КМ.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежено 67 хворих на первинний РШ, що перебували на лікуванні в Київському міському клінічному онкологічному центрі: чоловіків було 42 (62,7%), жінок — 25 (37,3%). Середній вік пацієнтів становив 68,6 року (від 29 до 81 року). Згідно з класифікацією TNM, 6-й перегляд [22], I стадію захворювання встановлено у 12 (17,9%), II — у 13 (19,4%), III — у 25 (37,3%), VI — у 17 (25,4%) хворих відповідно.

Хворі не отримували передопераційної хіміотерапії або променевої терапії. Гістологічний тип пухлини оцінювали згідно з класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я [23]. Усі пацієнти, які обстежувалися, були попереджені про проведення дослідження, дали інформовану згоду на участь у ньому та використання матеріалу з дослідницькою метою.

**Визначення рівня гіпоксії у тканині пухлини методом  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії.** Зразки пухлинної тканини шлунка отримували під час операції. Оцінку рівня гіпоксії проводили за допомогою  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії. Спектри перхлорних екстрактів тканини [24] реєстрували на спектрометрі Bruker 400 MHz (Widebore Ultrashield, AV-400 electronics, ФРН), використовуючи 5 мм кювети.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри вимірювали при 161,976 МГц зі спектральною шириною в 64 724,9 Гц, 90° шириною імпульсу, лінійним розширенням 10 Гц. Кількість сканів у середньому за спектрами становила 1024. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (MDPA) (Sigma, США) слугувала внутрішнім стандартом. Усі  $^{31}\text{P}$  хімічні зрушення у спектрах були співвіднесені до сигналу фосфокреатину (PCr), який був позначений як 0,0 ppm. Області спектральних сигналів в спектрах (за обчисленнями приладу) вимірювали інтегральним способом.  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри були отримані в Технічному центрі НАН України на базі Інституту металофізики ім. Г.В. Курдюмова НАН України.

**Визначення концентрації ФЛ у сироватці крові методом  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії.** Периферичну кров у хворих в об'ємі 7–10 мл забирали натщерце в стерильні пробірки перед операцією. Сироватку крові для аналізу отримували загальноприйнятним методом при центрифугуванні 4000 об./хв.

$^{31}\text{P}$  ЯМР-спектри сироватки крові вимірювали на спектрометрі Mercury-300BB (Varian, США), обладнаним Sparcs station, при 121,5 МГц зі спектральною шириною 12000 Гц; ширина імпульсу — 45°, лінійне розширення — 10 Гц, з використанням 5 мм пробірок.

Спектр ФЛ розміщується на ЯМР-шкалі в області сигналу ортофосфорної кислоти  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,00 ppm) у дуже вузькому діапазоні, тому стандартом слугувала МДРА, яка містилася в запаяному капілярі в ЯМР-пробірці зі зразком і яка має своє постійне місце на шкалі, а саме — 16,74 ppm.

Для ідентифікації розміщення інтегральних сигналів окремих ФЛ на ЯМР-шкалі, тобто їх хімічні зсуви —  $\delta$  [ppm], були встановлені хімічні зсуви стандартних ФЛ (Sigma, США), а саме фосфатидилхоліну (phosphatidylcholine — PC), лізофосфатидилхоліну (lysophosphatidylcholine — LPC), сфінгомієліну (sphingomyelin — SM), фосфатидилетаноламіну (phosphatidylethanolamine — PE) [21]. Концентрації обчислювали за стандартною формулою [12].

**Виявлення ДПК у КМ (імуноцитохімічний метод).**

КМ отримували пункцією стерильної кістки хворих на РШ перед оперативним втручанням в об'ємі від 2,0 до 3,5 мл. Для виявлення ДПК серед мононуклеарів КМ використовували моноклональні мишачі антитіла проти панцитокератину (panCK, clone AE1/AE3, Dako Cytomation, Данія). Кожний аналіз мав негативний контроль: забарвлення клітин у цитоспінових препаратах неспецифічним IgG<sub>1</sub> (MORC21, Sigma, США). Кількість ДПК обчислювали на 10<sup>6</sup> мононуклеарів КМ. Зразки КМ визначали як позитивні, якщо одну або більше ДПК реєстрували на 10<sup>6</sup> мононуклеарів КМ (досліджували від 6 до 12 препаратів від кожного хворого).

**Статистичні методи.** Статистичні аналізи виконано за допомогою пакетів прикладних програм NCSS 2000/PASS 2000 та Prism, version 4.3. Різницю між показниками оцінювали з використанням *t*-критерію Стюдента, прогностичне значення показників оцінювали за допомогою пропорційної моделі Сох з використанням  $\chi^2$  тесту та коефіцієнта вірогідності (odds ratio — OR). Статистична значущість прийнята при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Оцінку рівня гіпоксії тканини проводили за співвідношенням РМЕ/Рі (phosphomonoesters/inorganic phosphate), оскільки існує достовірна кореляція між рО<sub>2</sub> тканини та цим співвідношенням ( $p < 0,001$ ) [25, 26].

Рівні гіпоксії в тканині РШ у обстежених хворих, оцінені за допомогою ЯМР-спектроскопії, розподілялися таким чином: сильна гіпоксія — РМЕ/Рі  $< 1,0$ ; середня гіпоксія —  $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 1,4$ ; помірна гіпоксія —  $1,4 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$  і слабка гіпоксія —  $2,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,4$ , або пухлини є «задовільно» оксигенованими [27].

Встановлено, що гіпоксичні пухлини шлунка (сильна гіпоксія — РМЕ/Рі  $< 1,0$ ; середня гіпоксія —  $1,0 < \text{РМЕ/Рі} < 1,4$ ) в обстежених хворих становлять 67,9%, а оксигеновані (помірна гіпоксія —  $1,4 < \text{РМЕ/Рі} < 2,0$  і слабка гіпоксія —  $2,0 < \text{РМЕ/Рі} < 2,4$ ) — 34,1%.

ДПК у КМ були виявлені у 63,6% обстежених хворих на РШ, в тому числі з категорією М<sub>0</sub> — у 50,4%, з категорією М<sub>1</sub> — у 73,7% випадків. Виявлено асоціацію наявності ДПК у КМ із рівнем гіпоксії в пухлині: сильну і середню гіпоксію пухлини (РМЕ/Рі  $< 1,4$ ) визначено у 78,3% хворих із ДПК у КМ, тоді як помірну і слабку (РМЕ/Рі  $> 1,4$ ) — у 38,4% ( $p < 0,01$ ). Вірогідність появи ДПК у КМ хворих із категорією М<sub>0</sub> зростає майже в 5 разів в умовах сильної і середньої гіпоксії (РМЕ/Рі  $< 1,4$ ) у первинній пухлині (OR 4,83; 95% confidence interval (CI);  $\chi^2 = 5,023$ ;  $p < 0,001$ ), що свідчить про те, що гіпоксія відіграє ключову роль у процесі метастазування, а саме появи ДПК у КМ, як і було встановлено раніше [10].

З'ясовано, що концентрації всіх ФЛ, які реєструються на <sup>31</sup>P ЯМР-спектрах сироватки крові хво-

рих на РШ, а саме: РС, LPC, SM + PE, знижуються (на 37,6; 69 ( $p < 0,05$ ) та 26,7% відповідно) порівняно з цими показниками у донорській сироватці крові. Найбільш чутливим до метаболічних змін виявився LPC [21].

Виходячи з того, що концентрація як окремих ФЛ, так і їхньої сумарної кількості знижена у хворих на РШ, встановлено медіани концентрації для кожного з ФЛ сироватки крові, включаючи і сумарну концентрацію ( $\Sigma\text{PL}$ ). У табл. 1 представлено розподілення хворих щодо наявності в них ДПК у КМ залежно від медіани концентрації кожного окремого ФЛ у сироватці крові та продемонстровано, що чіткої залежності наявності ДПК у КМ від концентрацій РС, SM + PE, а також  $\Sigma\text{PL}$  не виявлено, хоча в більшості пацієнтів при зниженому рівні цих ФЛ в сироватці крові відмічають ДПК. Привертає до себе увагу LPC, при зниженому рівні якого (LPC  $< 0,160$  ммоль/л) ДПК у КМ фіксують у більш ніж 70% хворих. Встановлено, що вірогідність появи ДПК у таких пацієнтів зростає більш ніж у 6 разів (OR 6,99; 95% CI 1,586–25,508;  $\chi^2 = 8,118$ ;  $p < 0,01$ ), що свідчить про тісний взаємозв'язок між концентрацією LPC у сироватці крові і появою ДПК у КМ.

Таблиця 1

Наявність ДПК у КМ залежно від концентрації ФЛ в сироватці крові хворих на РШ

ДПК у КМ	ФЛ							
	РС, ммоль/л		LPC, ммоль/л		SM + PE, ммоль/л		$\Sigma\text{PL}$ , ммоль/л	
	M = 1,490*		M = 0,160*		M = 0,445*		M = 2,420*	
	< M	> M	< M	> M	< M	> M	< M	> M
Кількість хворих, %	56,3	51,0	71,4**	26,3	51,1	40,0	58,8	46,7

\*Медіана (M) ФЛ; \*\* $p < 0,05$ .

Наявність ДПК у КМ хворих залежно від концентрації окремих ФЛ і рівня гіпоксії в первинній пухлині наведено в табл. 2. Вірогідну різницю в появі ДПК у КМ пацієнтів відповідно до концентрації РС, SM + PE, а також сумарної кількості ФЛ ( $\Sigma\text{PL}$ ) при гіпоксії первинної пухлини виявити не вдалося, але простежується певна тенденція: при зниженій концентрації кожного із ФЛ, а також їх суми і за умови, що первинна пухлина знаходиться в стані гіпоксії, у більшості хворих у КМ містяться ДПК.

Таблиця 2

Кількість хворих із ДПК у КМ залежно від концентрації ФЛ у сироватці крові і гіпоксії в первинній пухлині

Рівень гіпоксії	ФЛ							
	РС		LPC		SM + PE		$\Sigma\text{PL}$	
	< M	> M	< M	> M	< M	> M	< M	> M
	Кількість хворих, %							
РМЕ/Рі $< 1,4$	58,4	53,4	69,0*	33,1	60,0	47,9	51,3	43,1
РМЕ/Рі $> 1,4$	53,2	45,2	56,9	37,5	56,2	41,9	47,9	40,1

\* $p < 0,05$ .

Лише концентрація LPC у сироватці крові хворих асоціюється з рівнем гіпоксії в первинній пухлині: за умов, коли в сироватці крові концентрація LPC знижена ( $LPC < 0,160$  ммоль/л), а первинна пухлина знаходиться в умовах сильної і середньої гіпоксії ( $PME/Pi < 1,4$ ), ДПК в КМ виявляють у 69,0% випадків ( $OR\ 3,44$ ; 95% CI 1,239–8,714;  $\chi^2 = 4,1$ ;  $p < 0,05$ ). Більш того, виявлено, що коли у таких хворих зі зниженим рівнем LPC первинна пухлина знаходиться в умовах сильної гіпоксії ( $PME/Pi < 1,0$ ), ДПК у КМ визначають у 81,8% хворих, і вірогідність появи ДПК у КМ зростає майже в 6 разів ( $OR\ 5,948$ ; 95% CI 1,528–23,11;  $\chi^2 = 7,15$ ;  $p < 0,01$ ).

Коли в сироватці крові хворих концентрація LPC не надто знижена ( $LPC > 0,160$  ммоль/л), а первинна пухлина знаходиться в умовах сильної і середньої гіпоксії ( $PME/Pi < 1,4$ ), ДПК в КМ виявляють у 33,1% випадків, а при помірній і слабкій ( $PME/Pi > 1,4$ ) гіпоксії в первинній пухлині — в 37,5%. Треба пам'ятати, що концентрація LPC  $> 0,160$  ммоль/л як медіани для LPC є умовною, встановленою для хворих онкологічного профілю і є значно нижчою порівняно з нижньою межею концентрації для цього ФЛ в крові практично здорових людей.

Головною метою сучасної аналітичної діагностичної стратегії в медицині є визначення якомога більшої кількості хімічних показників і факторів за мінімальних втручань. Ядерно-магнітна спектроскопія дозволяє проводити дослідження метаболічних характеристик ПК людини в клінічних умовах *in vitro* і *in vivo*.  $^{31}P$ -ядра надають інформацію про енергетичний статус (фосфокреатин, неорганічний фосфат, нуклеозидтрифосфати), фосфоліпідний метаболізм (фосфомоноестери і фосфодіестери), внутрішньоклітинний рН. Тому  $^{31}P$  ЯМР може використовуватися як чутливий індикатор рівнів багатоенергетичних фосфатів, що відтворює біоенергетичний статус тканини і, як наслідок, статус оксигенації і васкуляризації [28].

$^{31}P$  ЯМР-спектроскопія може бути використана як простий і інформативний метод визначення як рівня гіпоксії в тканині, так і концентрацій окремих ФЛ у сироватці периферичної крові хворих.

На матеріалі, отриманому від обстежених хворих на РШ, підтверджено, що гіпоксичний статус пухлини зумовлює появу ДПК у КМ [29]. Гіпоксичні пухлини у обстежених пацієнтів становлять майже 70%, ДПК у КМ виявляють у 63,6% усіх хворих (у тому числі з категорією  $M_0$  — у 50,4%), що збігається з даними сучасних досліджень, автори яких відмічають, що у 25–60% пацієнтів з категорією  $M_0$  при різних локалізаціях новоутворень у КМ містяться ПК [10, 30, 31]. Наявність ДПК в КМ асоціюється з несприятливим перебігом захворювання. Підтверджено асоціацію між рівнем гіпоксії первинної пухлини і наявністю ДПК в КМ: ПК в КМ виявлено в 78,3% випадків, коли у хворих первин-

на пухлина була гіпоксичною. Вірогідність появи ДПК в КМ хворих із категорією  $M_0$  зростає майже в 5 разів в умовах гіпоксії в первинній пухлині, тоді як при стані умовно задовільної гіпоксії ДПК в КМ відмічають у 38,4% пацієнтів. Отримані дані свідчать про позитивний вплив гіпоксія-асоційованих шляхів на процес вивільнення ПК із первинного вузла і їх дисемінації в КМ.

$^{31}P$  ЯМР-спектри сироватки крові обстежених хворих на РШ відтворюють системні зміни ФЛ порівняно з вмістом ФЛ у крові практично здорових людей-донорів, що збігається з даними доступної літератури щодо змін фосфоліпідного метаболізму у пацієнтів із саркомою, раком молочної залози, метастатичним раком печінки, лімфомою, злоякісними захворюваннями крові [18]. Автори публікацій надають інформацію щодо чутливості до терапії, появи резистентності до препаратів, прогнозу проявів процесу метастазування. Такі зміни можуть бути важливими для моніторингу клінічного перебігу захворювання за умов індивідуалізованої терапії.

Для проведення відповідного аналізу було необхідним встановити медіани значень концентрацій кожного із ФЛ, а також їх сумарної кількості в сироватці крові хворих на РШ, оскільки фосфоліпідний статус у пацієнтів онкологічного профілю значно відрізняється від показника у практично здорових людей. Значення цих медіан є умовними для розподілу хворих на групи з помірним ( $> M$ ) і суттєвим ( $< M$ ) зниженням концентрацій ФЛ, позаяк для здорових людей існують встановлені норми: PC —  $2,260 \pm 0,284$  ммоль/л, SM + PE —  $0,554 \pm 0,065$  ммоль/л, LPC —  $0,301 \pm 0,047$  ммоль/л,  $\Sigma PL$  —  $3,003 \pm 0,354$  ммоль/л.

Аналіз концентрацій ФЛ у сироватці крові хворих на РШ не виявив достовірної асоціації між рівнем PC, SM + PE, а також сумарною кількістю ФЛ  $\Sigma PL$  з наявністю ДПК у КМ, хоча певна тенденція існує. Ймовірно, є необхідність проведення подібних досліджень надалі за участю більшої кількості пацієнтів.

Серед ФЛ лише концентрація LPC в сироватці крові хворих виявилася найбільш значущою. Коли вона значно знижена ( $< M$ ), то у більше ніж 70% хворих є вірогідність наявності ДПК у КМ ( $p < 0,01$ ). Показано, що така асоціація посилюється за умов гіпоксії в первинній пухлині, про це свідчать проаналізовані зміни концентрацій кожного з фосфоліпідів залежно від рівня гіпоксії первинної пухлини. Виявилось, що така залежність існує лише для LPC, і, крім того, коли у таких хворих зі зниженим рівнем LPC первинна пухлина знаходиться в умовах сильної гіпоксії, вірогідність появи ДПК у КМ значно зростає — до 81% ( $p < 0,01$ ). Зниження концентрації ФЛ, а саме LPC, у сироватці крові пацієнтів із РШ свідчить про наявність у первинній пухлині гіпоксичного стану, який відображається в ступені агресивності пухлини, що підтверджує ключову

роль гіпоксії в появі ПК у КМ, а зміни концентрації LPC в крові можна розглядати як критерій стану пухлинної прогресії.

Існує декілька можливих пояснень таких метаболічних змін, асоційованих з раком. Вони можуть бути викликані підвищеною швидкістю фосфоліпідного метаболізму (можливо, індукованого більш високими концентраціями фосфомоноестерів і фосфодіестерів у ПК) або швидшою клітинною реплікацією ПК порівняно з іншими тканинами. Посилена проліферація ПК має призводити до збільшеної потреби в ФЛ. Можливе ще одне пояснення зниження рівня LPC в крові. Однією з найбільш важливих функцій LPC (крім того, що він бере участь у багатьох як фізіологічних, так і патологічних процесах в організмі) є утворення з нього лізофосфатидилової кислоти (lysophosphatidic acid — LPA), яка характеризується надзвичайною біоактивністю. Підвищена продукція LPA є загальною характерною рисою різних типів пухлин [32]. Це сильний плюрипотентний ліпідний медіатор, котрий діє через плазмо-мембраноасоційовані рецептори із широким спектром клітинних обов'язків. Він стимулює трансклітинну міграцію, адгезію, секрецію ангіогенних факторів, агрегацію тромбоцитів, регуляцію клітинної проліферації, захист від апоптозу, модуляцію хемотаксису. Деякі з цих клітинних обов'язків визначають LPA як медіатор пухлинної прогресії. LPA в дуже незначних концентраціях (60 мкМ/л) робить свій вагомий внесок у процес ініціації розвитку пухлини, посилює ангіогенез, міграцію клітин і їх виживаність, метастазування, резистентність до хіміотерапії [33]. ПК також можуть використовувати ФЛ, які містяться усередині пухлинного мікрооточення, не тільки для активації пухлинного процесу, але й для формування імуносупресивного мікрооточення, перешкоджаючи CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитам виконувати свої цитолітичні функції [34]. CD8<sup>+</sup> Т-клітини експресують декілька LPA рецепторів, в тому числі LPA<sub>5</sub>, який функціонує як додатковий інгібіторний рецептор. Встановлено, що пухлиноспецифічні CD8<sup>+</sup> Т-клітини, втрачаючи LPA<sub>5</sub>, можуть контролювати вже наявну прогресію більш ефективно, ніж пухлиноспецифічні CD8<sup>+</sup> Т-клітини, які мають у достатній кількості LPA<sub>5</sub> [35].

## ВИСНОВКИ

Таким чином, встановлено, що серед показників ФЛ у сироватці крові хворих на РШ (PC, LPC, SM + PE, ΣPL) лише зниження концентрації LPC асоціюється з появою ДПК в КМ. Цей зв'язок посилюється за умов гіпоксії в первинній пухлині, тому значне зниження концентрації LPC може вказувати на несприятливий перебіг захворювання. Особливо це стосується хворих у стані ремісії, коли раптове зниження рівня цього ФЛ може свідчити, що пацієнт, незважаючи на задовільний стан, знаходиться в групі ризику виникнення рецидиву захворюван-

ня і потребує спеціального контролю, що особливо важливо за умов індивідуалізації терапії. Отримані дані дають підставу розглядати зниження концентрації LPC в сироватці крові як можливий біомаркер пухлинної прогресії.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002193; 2012–2016 рр.).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kienle P, Koch M. Minimal residual disease in gastrointestinal cancer. *Semin Surg Oncol* 2001; **20**: 282–93.
2. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; **6**: 339–51.
3. Pantel K, Woelfle U. Detection and molecular characterization of disseminated tumor cells: implications for anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1756**: 53–64.
4. Jauch K-W, Heiss MM, Gruetzner U, et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 1810–17.
5. Osinsky S, Vaupel P. Tumor microphysiology. Kiev: Naukova Dumka, 2009: 94–108.
6. Semenza GL. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene* 2013; **31** (35): 4057–63.
7. Walsh JC, Lebedev A, Aten E, et al. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signaling* 2014; **21**: 1516–54.
8. Chouaib S, Messa Y, Couve S, et al. Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape. *Frontiers in Oncol* 2012; **3**: article 21, 1–10.
9. Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metabolism* 2014; **2**: 3–7.
10. Bubnovskaya L, Kovelskaya A, Gumenyuk L, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with tumor hypoxia and clinical relevance. *J Oncol* 2014; 2014, Article ID 582140, 7 p.
11. Podo F. Tumor phospholipid metabolism. *NMR Biomed* 1999; **12**: 413–39.
12. Tuz MA, Kuliszkiewicz-Janus M, Baczyński S. Application of <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy to observation of phospholipid concentration changes in blood serum, plasma, peripheral blood mononuclear cells and bone marrow mononuclear cells from patients with hematological cancer — a methodological review. *Polish J Chem* 2006; **80**: 1009–19.
13. Evelhoch J, Garwood M, Vigneron D, et al. Expanding the use of magnetic resonance in the assessment of tumor response to therapy: workshop report. *Cancer Res* 2005; **65**: 7041–5.
14. Rafflet K, Moka D, Süllentrop F, et al. Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an *in vitro* <sup>31</sup>P high-resolution NMR study. *NMR Biomed* 2000; **13**: 8–13.
15. Süllentrop F, Moka D, Neubauer S, et al. <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. *NMR Biomed* 2002; **15**: 60–8.
16. Merchant TE, Rasmuson JN, de Graaf PW, et al. Phospholipid profiles of human colon cancer using <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. *Int J Colorectal Dis* 1991; **6**: 121–26.
17. Merchant TE, Meneses P, Gierke LW, et al. <sup>31</sup>P magnetic resonance phospholipid profiles of neoplastic human breast tissue. *Br J Cancer* 1991; **63**: 693–98.

18. **Kuliszkiewicz-Janus M, Janus W, Baczyński S.** Application of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipid in leukemia, lymphoma and some other non-hematological cancers. *Anticancer Res* 1996; **16**: 1587–94.

19. **Kuliszkiewicz-Janus M, Tuz MA, Kielbiński M, et al.**  $^{31}\text{P}$  MRS analysis of the phospholipid composition of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bone marrow mononuclear cells (BMMC) of patients with acute leukemia (ASL). *Cell Mol Biol Lett* 2009; **14**: 35–45.

20. **Evelhoch J, Garwood M, Vigneron D, et al.** Expanding the use of magnetic resonance in the assessment of tumor response to therapy: Workshop Report. *Cancer Res* 2005; **65**: 7041–4.

21. **Бубновська ЛМ, Михайленко ВМ, Ковельська АВ та ін.** Визначення концентрації фосфоліпідів в сироватці крові хворих на рак шлунка за допомогою  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопії. 36: Лучевая диагностика, лучевая терапия 2014; **3–4**: 20–7.

22. International Union Against Cancer, TNM Classification of Malignant Tumors, ed. by L.H. Sobin and C. Wittekind, Wiley-Liss, New York, NY, USA, 6th edition, 2002.

23. **Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, et al.** Gastric carcinoma. In: World Health Organization Classification of Tumors. Tumours of the Stomach (SR Hamilton LA Aaltonen, eds.), Lyon, IARC Press 2000; **3**: 39–52.

24. **Бубновська ЛМ, Ковельська АВ, Болдескул ІЄ та ін.** Рівень гіпоксії у тканині раку шлунка та перебіг захворювання. *Онкологія* 2009; **1**: 39–43.

25. **Vaupel P, Okunieff P, Kallinowski F, et al.** Correlation between  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy and tissue  $\text{O}_2$  tension measurements in a murine fibrocarcoma. *Radiat Res* 1989; **120**: 477–93.

26. **Rofstad EK, De Muth D, Fenton BM, Sutherland RM.**  $^{31}\text{P}$  Nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of tumor energy metabolism and its relationship to intracapillary oxyhemoglobin saturation status and tumor hypoxia. *Cancer Res* 1988; **48**: 5440–46.

27. **Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, et al.** Hypoxia, tumour-associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin Transl Oncol* 2011; **13**: 133–38.

28. **Glickson JD, Evanochko WT, Sakai TT, Ng NC.** *In vivo* NMR studies of RIF-1 tumors. In: Magnetic Resonance in Cancer. *Allen P, Boisvert DPJ, Lenth BC* (eds), Toronto: Pergamon Press, 1986: 71–82.

29. **Vaupel P, Maye A.** Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Met Rev* 2007; **26**: 225–39.

30. **Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K.** Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 5013–21.

31. **Lin H, Balic M, Zhengy S, et al.** Disseminated and circulating tumor cells: role in effective cancer management. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2011; **77**: 1–11.

32. **Sasagawa T, Okita M, Murakami J, et al.** Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* 1999; **34**: 17–21.

33. **Shida D, Kitayama J, Yamaguchi H, et al.** Lysophosphatidic Acid (LPA) enhanced the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. *Cancer Res* 2003; **63**: 1706–11.

34. **Oda SK, Strauch P, Fujiwara Y, et al.** Lysophosphatidic Acid inhibits CD T-cell activation and control of tumor progression. *Cancer Immunol Res* 2013; **1**: 245–55.

35. **McIntyre TM, Pontsler A, Silva A, et al.** Identification of an intracellular receptor for Lysophosphatidic Acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR $\gamma$  agonist. *PNAS* 2003; **100**: 131–36.

## CONCENTRATIONS OF PHOSPHOLIPIDS IN BLOOD SERUM OF GASTRIC CANCER PATIENTS, LEVEL OF TUMOR HYPOXIA: ANALYSIS OF POSSIBLE ASSOCIATION WITH MINIMAL RESIDUAL DISEASE

*L.N. Bubnovskaya, V.M. Mikhailenko, S.P. Merentsev, V.V. Trachevsky, I.I. Ganusevich*

**Summary. Aim:** to determine the possible associations between changes of phospholipids concentrations in blood serum, levels of primary tumor hypoxia and availability of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) in patients with gastric cancer (GC). **Patients and methods:** a total of 67 patients with primary GC were diagnosed and treated at the Kyiv City Clinical Oncological Center. The level of tumor hypoxia as well concentrations of phospholipids in blood serum were evaluated using  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. DTCs were detected using immunocytochemistry. **Results:** it was determined that under low concentrations of lysophosphatidylcholine (LPC < 0.160 mmol/l) in blood serum in patients the probability of appearance of tumor cells in BM is increased by a factor of 6,99 (odds ratio 699; 95% confidence interval 1.586–25.508;  $\chi^2 = 8.118$ ;  $p < 0.01$ ) and DTCs in BM were persisted in 81,8% of patients ( $p < 0.01$ ) when primary tumors were characterized by severe and moderate hypoxia. **Conclusion:** it was shown that there is a relationship between LPC concentrations in blood serum of GC patients and minimal residual disease, namely: reduction of LPC levels are associated with availability of DTCs in BM ( $p < 0.01$ ) and such association is enhanced by the hypoxia in primary tumor ( $p < 0.01$ ). It is suggested that changes of LPC concentrations in blood serum of patients with GC may be as relevant biomarker of tumor progression for monitoring of disease outcome and may be of great importance to predict the recurrence especially under individualizing therapy.

**Key Words:** gastric cancer, hypoxia, disseminated tumor cells, phospholipids, lysophosphatidylcholine.

### Адреса для листування:

Бубновська Л.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: osinskySP12@ukr.net

Одержано: 11.10.2016