

А.В. Ковельська  
С.П. Меренцев  
І.Є. Болдеску  
Л.М. Бубновська

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

Київська міська онкологічна  
лікарня

Інститут прикладної фізики  
НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак шлунка,  
<sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопія,  
перхлорний екстракт тканини,  
рівень лактату, метаболічне  
співвідношення Lас/Сr.

## РІВЕНЬ ЛАКТАТУ ТА <sup>1</sup>H ЯМР МЕТАБОЛІЧНЕ СПІВВІДНОШЕННЯ ЛАКТАТ/КРЕАТИН У ТКАНИНІ РАКУ ШЛУНКА ЛЮДИНИ І ПРОГНОЗ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ

**Резюме.** Проведений порівняльний аналіз методів визначення рівня лактату в тканині РШ і оточуючій пухлину слизовій оболонці ферментативним методом та за допомогою <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії перхлорних екстрактів тканини з метою встановлення можливості використання <sup>1</sup>H ЯМР-співвідношення Lас/Сr у якості достовірного показника рівня лактату в тканині. Отримані дані довели, що рівень лактату в тканині може бути достовірно оцінений метаболічними співвідношеннями Lас/Сr, який доцільно використовувати при проведенні <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії перхлорних екстрактів операційного матеріалу хворих на РШ та <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії in vivo (ЯМР-зображення) при первинній діагностиці РШ у якості маркера прогнозу перебігу захворювання та індивідуалізації протипухлинної терапії.

Посилений аеробний гліколіз у пухлинній тканині являє собою унікальне явище, відоме ще з ранніх робіт О. Warburg [1]. При високому рівні гліколізу природно очікувати утворення у пухлині великої кількості лактату, який буде затримуватись у її тканині або виходити у кровоносне русло. Підвищення рівня лактатемії у онкологічних хворих та експериментальних тварин з різними пухлинами вказує на вихід лактату з пухлини у кров [2, 3]. Водночас відомо, що судинний простір пухлини у 3 рази менший, ніж, наприклад, печінки, і в різних пухлинах швидкість кровообігу знижена у багато разів порівняно з нормальними тканинами [4]. Завдяки цьому вміст лактату у пухлині буде істотно зростати, що вперше було описано в експериментах С. Cori і G. Cori [5] та М. Reiss і А. Hochwald [6].

У роботах останніх років було показано, що в первинних пухлинах шийки матки [7], голови та шиї [8], колоректальних карциномах [9] різко зростає вміст лактату. Було встановлено, що у високоагресивних пухлинах лактат накопичується швидше порівняно з менш злоякісними пухлинами, причому вже на ранніх стадіях розвитку процесу. Збільшене накопичення лактату, що зумовлює позаклітинне зниження рН, може зменшувати адгезивні властивості пухлинних клітин у межах злоякісної тканини і таким чином посилювати їх розповсюдження у віддалені органи. Показано, що високий вміст лактату корелює з вищою частотою утворення як віддалених метастазів, так і невисокими показниками виживаності хворих уже на ранніх стадіях розвитку пухлинного процесу [10]. Висловлено припущення, що вміст лактату у первинній пухлині може бути основою нової метаболічної класифікації пухлин, яка буде сприяти підвищенню ефективності лікування онкологічних хворих [11].

На шляху до реалізації цієї ідеї необхідним є розширення спектра пухлин людини, які були б досліджені з позиції встановлення клінічного значення вмісту лактату у пухлині та його зв'язку з перебігом захворювання. Слід також зауважити, що визначення вмісту лактату у пухлині не тільки біохімічним методом, але і за допомогою ЯМР-спектроскопії, яка дозволяє визначати різні важливі для життєдіяльності пухлинних клітин метаболіти, зокрема воденьвімісні, розширює можливості та підсилює клінічну значущість такого дослідження.

У цій роботі була зроблена спроба здійснити порівняльний аналіз методів визначення вмісту лактату у пухлині біохімічним методом і за допомогою <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії та оцінити його можливе використання у якості прогностичного маркеру.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Операційний матеріал (пухлинна тканина та оточуюча її нормальна слизова оболонка шлунка) був отриманий від 104 хворих, які підлягали хірургічному втручання, з діагнозом первинний рак шлунка (РШ). Передопераційної терапії хворі, операційний матеріал яких було використано для досліджень, не отримували. Матеріал був наданий Київською міською онкологічною лікарнею. Усі хворі були проінформовані про обстеження та надали згоду на використання хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях. Клінічні характеристики наведені у таблиці. Пухлинну та нормальну (за межами обов'язкового оперативного видалення) тканини отримували в процесі їх оперативного видалення і миттєво занурювали в рідкий азот. Оцінку вмісту лактату проводили за допомогою біохімічного методу та <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії в перхлорних екстрактах (ПХЕ) тканин (тканина РШ, нормальна слизова оболонка шлунка).

Таблиця

## Розподіл хворих на РШ

| Показник                      | Кількість хворих, % |
|-------------------------------|---------------------|
| Вік (роки; середнє, розподіл) | 61,8 (32–80)        |
| Чол.                          | 61 (58,6)           |
| Жін.                          | 43 (41,4)           |
| Категорія pT                  |                     |
| T1                            | 2 (1,9)             |
| T2                            | 17 (16,4)           |
| T3                            | 57 (54,8)           |
| T4                            | 28 (26,9)           |
| Категорія pN                  |                     |
| N0                            | 40 (38,5)           |
| N1                            | 38 (36,5)           |
| N2                            | 26 (25,0)           |
| Стадія TNM                    |                     |
| I                             | 14 (13,5)           |
| II                            | 23 (22,2)           |
| III                           | 38 (36,5)           |
| IV                            | 29 (27,8)           |
| Гістологічна структура        |                     |
| Аденокарцинома                | 81 (77,9)           |
| Слизовий рак                  | 5 (4,8)             |
| Персневидно-клітинний рак     | 6 (5,8)             |
| Недиференційований рак        | 12 (11,5)           |
| Ступінь диференціювання       |                     |
| G1                            | 0                   |
| G2                            | 18 (17,3)           |
| G3                            | 60 (57,7)           |
| G4                            | 26 (25,0)           |
| Локалізація пухлини           |                     |
| Верхня третина шлунка         | 24 (23,1)           |
| Середня третина               | 24 (23,1)           |
| Нижня третина                 | 52 (50,0)           |
| Тотальне ураження             | 3 (2,9)             |
| Віддалені метастази           |                     |
| Відсутні (M0)                 | 92 (88,5)           |
| Присутні M1                   | 12 (11,5)           |
| Усього                        | 104 (100,0)         |

Для отримання ПХЕ тканину розтирали в рідкому азоті до порошковидного стану, давали трохи відтанути та інкубували на льоду при постійному помішуванні. Подалі проводили екстракцію за допомогою охолодженого 1,2 н розчину  $\text{HClO}_4$ . Холодну деіонізовану воду додавали в певному обсязі та центрифугували (9000 об./хв, 40 хв) для видалення клітинного дебрису. Потім рН ПХЕ доводили до 7,6–8,0 за допомогою 5 н розчину КОН, центрифугували (9000 об./хв, 20 хв) для видалення преципітату  $\text{KClO}_4$ . Дівалентні іони видаляли за допомогою Chelex (10 мг/5 мл надосадової рідини) (Sigma, США). Зразки фільтрували, ліофілізували та зберігали при  $-20^\circ\text{C}$ . Перед реєстрацією ЯМР-спектрів ліофілізовані зразки розчиняли в 1,0 мл  $\text{D}_2\text{O}$ , центрифугували і переносили в ЯМР-пробірку для подальшого ЯМР-аналізу.

$^1\text{H}$  ЯМР-спектри реєстрували на спектрометрі Bruker 400 MHz (Widebore Ultrashield, AV-400 electronics, Німеччина), використовуючи 5 мм кювети.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектри ПХЕ тканин вимірювали при 400,13 MHz зі спектральною шириною в 8250 Hz та  $90^\circ$  шириною імпульсу, затримкою в 20 с. Натрієва сіль 3-(триметилсіліл)пропіонової кислоти (0,75% розчин у  $\text{D}_2\text{O}$ ) слугувала за внутрішній стандарт (0,0 ppm). За таких умов резонансні сигнали лактату (Lac) та креатину (Cr) на  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрах реєструються на 1,3 ppm та 3,06 ppm відповідно. Області спектральних сигналів на спектрах вимірювалися інтегральним способом, які обчислював прилад.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектри були отримані в Центрі колектив-

ного користування НАН України на базі Інституту металофізики НАН України.

Вміст лактату ( $\mu\text{моль/г}$ ) в тканині РШ та оточуючій пухлині «нормальній» слизовій оболонці визначали ферментативним методом за Н. Hohorst [12] з використанням лактатдегідрогенази.

Проводили відповідну статистичну обробку отриманих результатів: кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнтів кореляції Pearson ( $r$ ) та Spearman ( $\rho$ ). Прогностичне значення показників оцінювали за допомогою пропорційної моделі Cox з використанням  $\chi^2$  тесту та коефіцієнту ризику (hazard ratio). Вживаність хворих визначали за методом Kaplan — Meier, розбіжності між кривими виживаності аналізували за допомогою тесту log-rank. Статистична значимість прийнята при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При первинному діагнозі хворого на РШ визначити рівень того чи іншого метаболіту в пухлині, який може бути маркером перебігу захворювання, без отримання принаймні біопсійного матеріалу неможливо. Новітні методи діагностики, такі як ЯМР-спектроскопія *in vivo* (NMR imaging — ЯМР-зображення), дозволяють це зробити. Для того, щоб пересвідчитися, чи може  $^1\text{H}$  ЯМР-метаболічний показник відображати вміст лактату в пухлині і бути надійним в оцінці того, які пухлини слід розглядати як пухлини з високим рівнем лактату, а які ні, була проведена  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопія ПХЕ тканин РШ і слизової оболонки шлунка. Метод є дуже чутливим і надає повний хімічний склад речовин на момент фіксації тканини. На рис. 1 представлені типові  $^1\text{H}$  ЯМР-спектри тканин РШ і оточуючої слизової оболонки.

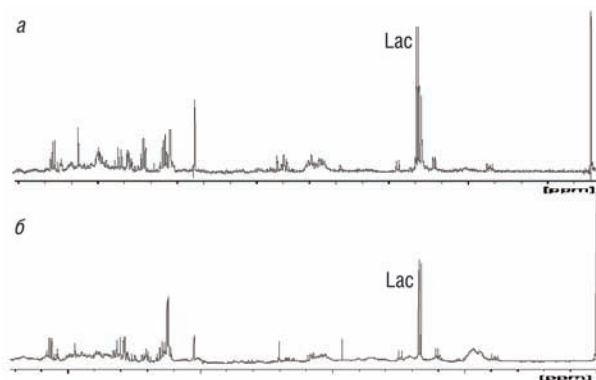
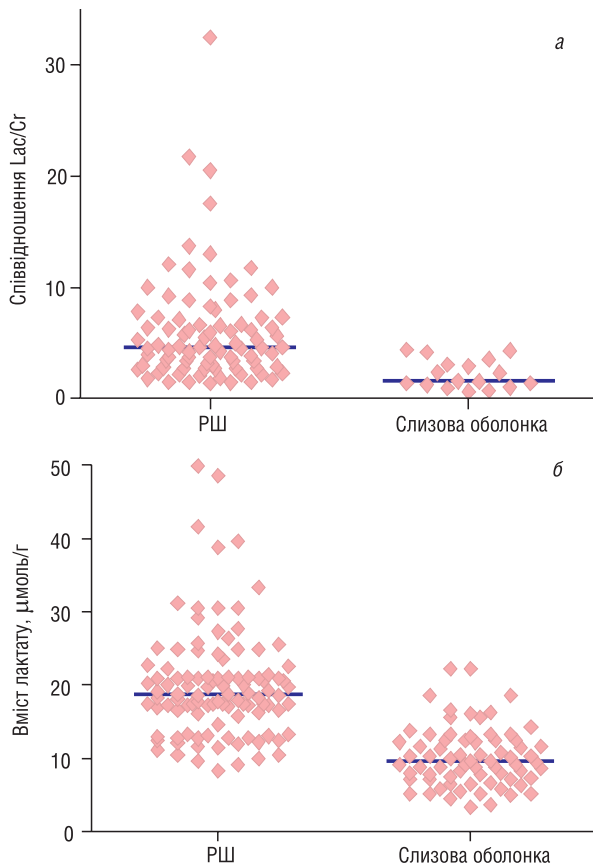


Рис. 1. Типовий  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр тканини РШ (а) та оточуючої її слизової оболонки (б). На рисунку представлені копії спектрів з оригінального запису спектрів хворого З.А.А.

Щоб мати можливість проаналізувати рівні певних речовин в однотипових зразках на усіх спектрах та співставити поміж собою, в ЯМР-спектроскопії біологічних об'єктів користуються так званими метаболічними співвідношеннями, а саме співвідношеннями інтегралів резонансних сигналів речовин, що відображають взаємозв'язок цих речовин у зразку

тканини. Оскільки нас цікавив рівень лактату в тканині, було використано  $^1\text{H}$  ЯМР-співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$ . Креатин, як відомо, належить до енергетичної складової метаболізму клітини, яка в будь-яких умовах намагається підтримувати пул креатину на відносно постійному рівні. Тому метаболічне співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$  є більш стабільним показником, який співвідноситься із загальним метаболічним станом клітини. Нами було проведено співставлення  $^1\text{H}$  ЯМР-спектрів метаболічних співвідношень  $\text{Lac}/\text{Cr}$  для тканини РШ і слизової оболонки з вмістом лактату в тих самих тканинних зразках, що визначався ферментативним методом.

Так як у клінічних дослідженнях користуються медіаною як відправною точкою для розподілу хворих за групами, була знайдена медіана рівня лактату, визначеного кожним окремих методом. Медіана метаболічного співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$  для тканини РШ дорівнювала 4,6 (1,4–32,5), тоді як для слизової оболонки, розміщеної на певній відстані від пухлини, — 1,5 (0,6–4,4) (рис. 2а). Медіана вмісту лактату, визначеного ферментативним методом, для тканини РШ дорівнювала 18,7  $\mu\text{моль}/\text{г}$  (8,3–49,9), для слизової оболонки — 9,5  $\mu\text{моль}/\text{г}$  (3,3–22,1) (рис. 2б).

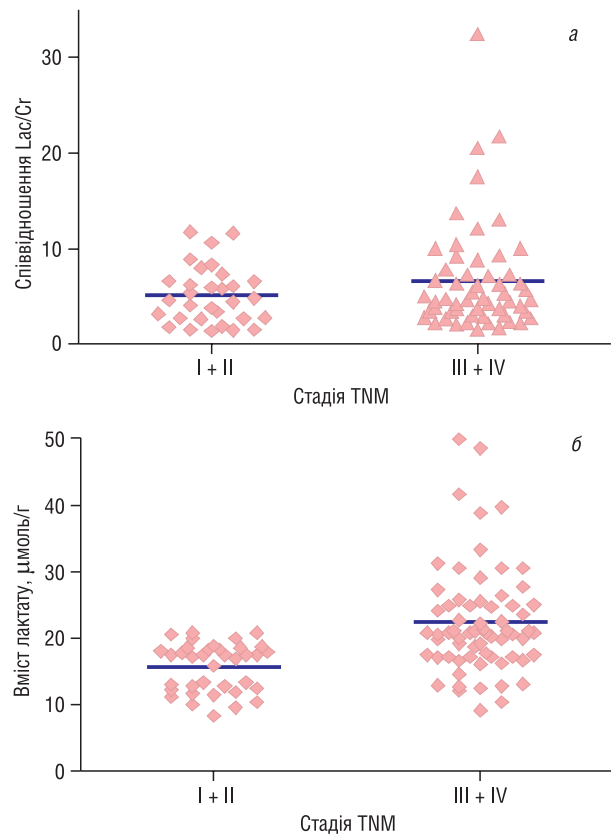


**Рис. 2.** Розподіл індивідуальних значень та величин медіани: а —  $^1\text{H}$  ЯМР-співвідношень  $\text{Lac}/\text{Cr}$  в тканині РШ та оточуючій її слизовій оболонці; б — вмісту лактату, визначеного ферментативним методом, у тканині РШ та оточуючій її слизовій оболонці

За обох методів визначення спостерігали достовірну різницю між значеннями медіан для пухлини і слизової оболонки шлунка ( $p < 0,001$ ). Віднос-

но медіани усі пухлини умовно поділяються на такі, що мають низький рівень лактату ( $< 4,6$  для співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$  або  $< 18,7$   $\mu\text{моль}/\text{г}$  при визначенні ферментативним методом) або високий, — більше значення медіани. Як видно з розкиду, рівень лактату в тканині РШ дуже варіює: вміст лактату в пухлині може бути як відносно низьким, так і виключно високим. У середньому рівень лактату в пухлинній тканині згідно зі значеннями метаболічного співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$  приблизно в 3 рази вищий ( $p = 0,039$ ), а згідно з визначенням ферментативним методом у 2 рази вищий ( $p = 0,027$ ) порівняно з таким у нормальній слизовій оболонці шлунка.

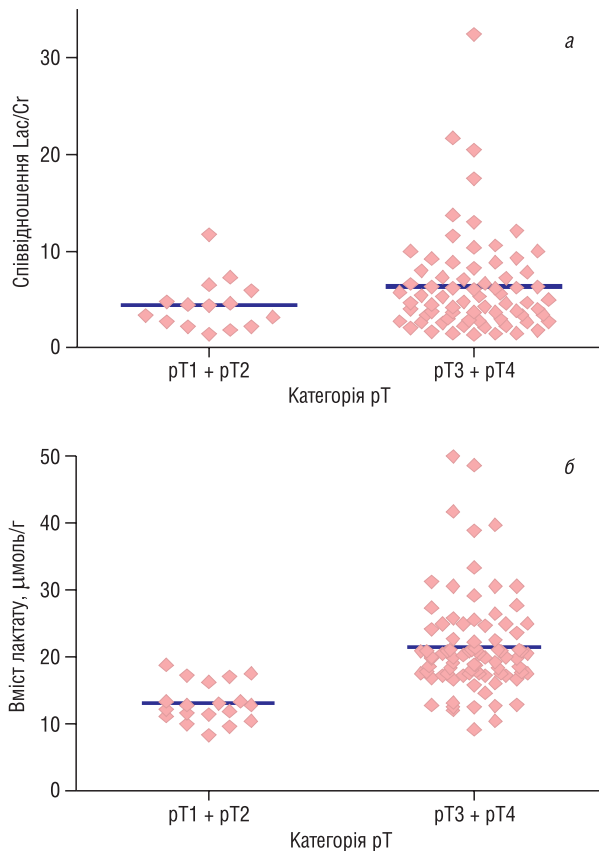
Проведений порівняльний аналіз як значень метаболічного показника  $\text{Lac}/\text{Cr}$ , так і вмісту лактату, визначеного ферментативним методом, з основними клініко-патологічними характеристиками РШ. Не було виявлено кореляції ні співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$ , ні вмісту лактату з гістологічним типом чи ступенем диференціювання пухлини, але спостерігалася статистично достовірна кореляція співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$  ( $p = 0,0413$ ) зі стадією розвитку процесу (рис. 3а). Аналогічна кореляція ( $p = 0,029$ ) була встановлена і для вмісту лактату у тканині РШ, визначеного ферментативним методом (рис. 3б).



**Рис. 3.** Рівень лактату в тканині РШ відповідно до стадій процесу за TNM: а — згідно з  $^1\text{H}$  ЯМР метаболічним показником  $\text{Lac}/\text{Cr}$ ; б — при визначенні ферментативним методом

Слід також відзначити, що співвідношення  $\text{Lac}/\text{Cr}$  у пухлинах хворих з категорією  $\text{pT3} + \text{pT4}$  було дещо більшим (в 1,4 рази,  $p = 0,785$ ) порівняно

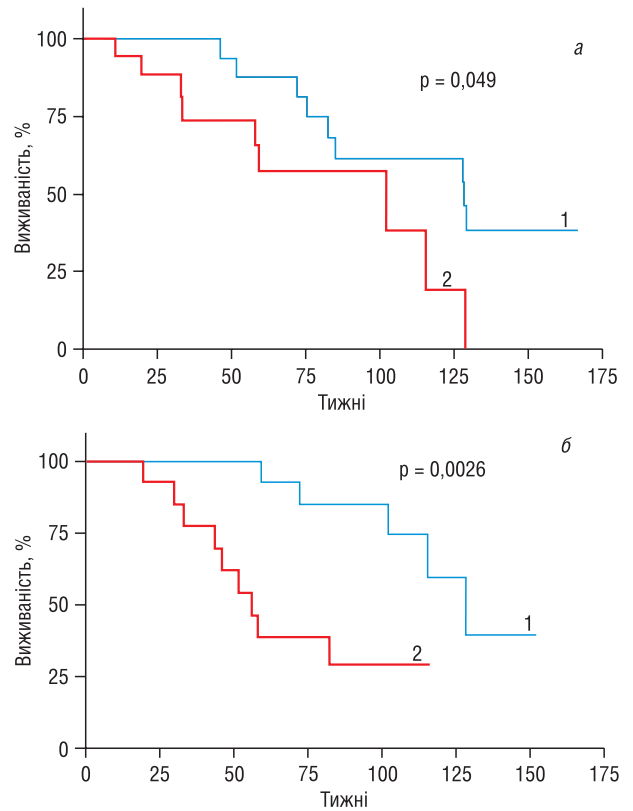
з таким у хворих з категорією pT1 + pT2. (рис. 4а). Така ж тенденція була виявлена і при аналізі даних вмісту лактату, визначеного ферментативним методом (в 1,5 раза,  $p = 0,0652$ ) (рис. 4б).



**Рис. 4.** Рівень лактату в тканині РШ відповідно до стадій процесу за TNM: а — згідно з  $^1\text{H}$  ЯМР метаболічним показником Lac/Cr; б — при визначенні ферментативним методом

Слід при цьому зазначити, що у хворих на РШ з категорією pT4 не спостерігали суттєвого збільшення вмісту лактату у пухлині порівняно з такими при pT3:  $20,3 \pm 1,0$   $\mu\text{моль/г}$  при pT3 і  $22,9 \pm 1,5$   $\mu\text{моль/г}$  при pT4. Пояснити це спостереження, яке співпадає з літературними даними, може та обставина, що у великих пухлинах зони некрозу значно більші; лактат же, як відомо, продукується життєздатними клітинами, які знаходяться у добре перфузованих ділянках пухлини [13]. Виходячи з цього, стає зрозумілим, чому вміст лактату в первинній пухлині корелює зі злоякісною прогресією тільки на ранніх стадіях процесу [10, 11].

При аналізі зв'язку вмісту лактату в тканині РШ з виживаністю хворих, яким було запроваджено тільки хірургічне втручання, виявилось, що при низькому рівні лактату в пухлині (менше медіани), спостерігається достовірно довша тривалість життя, ніж за умов, коли рівень лактату в пухлині був високим (вище медіани). Це положення дійсне у випадках, коли рівень лактату оцінювали як метаболічним співвідношенням Lac/Cr ( $\chi^2 = 3,876$ ,  $p = 0,049$ ), так і ферментативним методом ( $\chi^2 = 9,086$ ,  $p = 0,026$ ) (рис. 5а, б).



**Рис. 5.** Криві виживаності хворих на РШ за Капланом — Майером (розподіл хворих: а — відповідно до медіани  $^1\text{H}$  ЯМР метаболічного показника Lac/Cr у пухлині; б — відповідно до медіани вмісту лактату в пухлині, визначеного ферментативним методом)

Несприятливий перебіг захворювання пацієнтів з пухлинами з високим вмістом лактату може бути пов'язаний з високим рівнем внутрішньопухлинної гіпоксії, яка, як відомо, є однією з основних характерних особливостей злоякісної пухлини [14]. Аналіз отриманих даних показав, що спостерігається статистично достовірний зворотний кореляційний зв'язок ( $p = 0,0487$ ) між рівнями гіпоксії і лактату у тканині РШ за умов, коли пухлинна тканина є умовно гіпоксичною. Водночас рівень лактату у пухлині може надати ще й додаткову інформацію щодо перебігу захворювання. Зважаючи на той факт, що тканина РШ відносно добре окисенована (за оцінкою  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопії [15]), коли за таких умов, тобто за сприятливих для перебігу захворювання, спостерігається високий вміст лактату (вище медіани), ризик несприятливого перебігу захворювання зростає майже вдвічі (коефіцієнт ризику (hazard ratio) для співвідношення Lac/Cr і для вмісту лактату, визначеного ферментативним методом, дорівнював 1,76;  $p = 0,0446$  і 2,0;  $p = 0,0398$ , відповідно).

Таким чином, отримані дані вказують на те, що співвідношення Lac/Cr є достовірним показником рівня лактату в тканині РШ, який може слугувати фактором прогнозу перебігу захворювання та виживаності хворих. Слід зазначити, що це може бути особливо важливим при первинному діагнозі РШ за допомогою  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопії *in vivo* (ЯМР-зображення).



## ВИСНОВКИ

1. Метаболічне співвідношення Лас/Сг є достовірним показником рівня лактату в тканині РШ, що підтверджено даними, отриманими при визначенні вмісту лактату ферментативним методом.

2. Метаболічне співвідношення Лас/Сг може слугувати маркером прогнозу несприятливого перебігу захворювання.

3.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопія перхлорних екстрактів пухлинної тканини, отриманої під час оперативного втручання, та  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопія *in vivo* (ЯМР-зображення) хворих на РШ може бути запроваджена при первинній діагностиці та з метою прогнозування перебігу захворювання та індивідуалізації протипухлинної терапії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Warburg O. The metabolism of tumors. London: Constable, 1930.
2. Jurga L, Klyvana M, Matula P, *et al.* Importance of determinations of serum hexokinase, aldolase and lactate dehydrogenase activities and of the lactate/pyruvate quotient in the diagnosis of malignant tumors. Neoplasma 1978; **25**: 95–106.
3. Осинський СП, Повжиткова МС. Новые данные о селективности закисления опухолевой ткани. Онкология вып 9. Киев: Наук думка, 1977: 38–40.
4. Gullino PM, Grantham FH. The vascular space of growing tumors. Cancer Res 1964; **24**: 1727–32.
5. Cori CF, Cori GF. The carbohydrate metabolism of tumors. J Biol Chem 1925; **64**: 11–22.
6. Reiss M, Hochwald A. Experimentelle Beeinflussung des Tumorstoffwechsels am lebenden Tier. Med Klin 1932; **28**: 1391–5.
7. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, *et al.* High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. Cancer Res 2000; **60**: 916–21.
8. Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, *et al.* Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; **51**: 349–53.
9. Walenta S, Chau TV, Schroeder T, *et al.* Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: A novel guideline for clinical oncologists? J Cancer Res Clin Oncol 2003; **129**: 321–6.
10. Walenta S, Mueller-Klieser WF. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. Semin Rad Oncol 2004; **14**: 267–74.
11. Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser WF. Lactate in solid malignant tumors: potential of metabolic classification in clinical oncology. Curr Med Chem 2004; **11**: 2195–204.

12. Hohorst H. L-(+) lactate determination with lactic dehydrogenase and DPN. In: Methods of Enzymatic Analysis / Ed. H Bergmeyer / Acad Press, 1965: 266–70.

13. Carcia-Martin M-L, Herigault G, Remy C, *et al.* Mapping extracellular pH in rat brain gliomas *in vivo* by  $^1\text{H}$  Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging: comparison with maps of metabolites. Cancer Res 2001; **61**: 6524–31.

14. Осинський СП, Глузман ДФ, Клифф Й и др. Молекулярная диагностика опухолей. Киев, 2007. 246 с.

15. Осинський СП, Бубновська ЛМ, Ковельська АВ та ін. Рівень гіпоксії у тканині раку шлунка та перебіг захворювання. Онкология 2009; **11** (1 (39)): 39–44.

## LACTATE LEVEL AND $^1\text{H}$ NMR METABOLIC RATIO LACTATE/CREATINE IN HUMAN GASTRIC CANCER AND PROGNOSIS OF DISEASE OUTCOME

A.V. Kovelska, S.P. Merentsev, I.Ye. Boldeskul,  
L.M. Bubnovska

**Summary.** *It was provided the comparative analysis of lactate levels in gastric cancer as well as in surrounding mucous determined by biochemical method and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of tissue perchloric acid extracts with the aim to elucidate the possibility to use the  $^1\text{H}$  NMR metabolic ratio Lac/Cr as reliable index of tissue lactate level. Obtained data confirmed that tissue lactate level may be reliably evaluated with  $^1\text{H}$  NMR metabolic ratio Lac/Cr.  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of perchloric acid extracts of surgical tumor specimens and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy *in vivo* (NMR imaging) may be suitable for presurgical diagnosis as a marker for prognosis of disease outcome and for individualization of antitumor therapy.*

**Key Words:** gastric cancer,  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, tissue perchloric acid extracts, lactate level, metabolic ratio Lac/Cr.

### Адреса для листування:

Ковельська А.В.  
03022, Київ, вул. Васильківська, 45  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України