

І.І. Ганусевич¹
Л.Д. Гуменюк¹
Л.А. Мамонтова¹
С.П. Меренцев²
С.П. Осинський¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАМН України, Київ, Україна

²Київський міський клінічний онкологічний центр МОЗ України

Ключові слова: пухлино-асоційовані макрофаги, матриксні металопротеїнази, рак шлунка, виживаність хворих.

ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНІ МАКРОФАГИ ТА ВМІСТ АКТИВНИХ ФОРМ ЖЕЛАТИНАЗ У ТКАНИНІ РАКУ ШЛУНКА: ЗВ'ЯЗОК З ВИЖИВАНІСТЮ ХВОРИХ

Пухлиноасоційовані макрофаги (ПАМ) є важливим фактором мікрооточення пухлинних клітин та продуцентами матриксних металопротеїназ (ММП) — ферментів, що забезпечують деструкцію позаклітинного матриксу в процесах інвазії, неангіогенезу та метастазування. **Мета:** дослідити взаємозалежність між кількістю ПАМ (CD68-позитивних клітин) та концентраціями активних форм желатиназ А і В (ММП-2 та -9) в пухлинній тканині, їх зв'язок із клініко-патологічними характеристиками та виживаністю хворих на рак шлунка (РШ). **Методи:** імуногістохімічний, зимографія. **Результати:** виявлено пряму позитивну кореляцію між кількістю ПАМ та концентраціями активних форм ММП-2 та -9 в тканині РШ. Показано, що хворі на РШ, в пухлинах яких була мала кількість ПАМ (< 23%) та низька концентрація активних форм ММП-2 (< 2 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. **Висновки:** визначення кількості ПАМ та концентрації активних форм желатиназ може бути використано для контролю перебігу захворювання у пацієнтів із РШ.

ВСТУП

Однією з головних ознак запалення, пов'язаного з пухлиною, є наявність у пухлині так званих пухлиноасоційованих макрофагів (ПАМ) [1–3]. ПАМ походять від циркулюючих моноцитів, які селективно «притягуються» у пухлинне мікрооточення факторами хемотаксису. Показано, що рівень хемокіну CCL2, який походить з пухлини, корелює зі щільністю ПАМ у пухлинах яєчника, грудної та підшлункової залоз та в інших новоутвореннях людини [2, 4]. Встановлено, що такі хемокіни, як CCL5, CCL7, CCL8, CXCL12, або цитокіни, зокрема фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor — VEGF), фактор росту, похідний з тромбоцитів (platelet-derived growth factor — PDGF), та макрофагальний колонієутворюючий фактор (macrophage colony-stimulating factor — M-CSF), «притягують» моноцити з периферійної крові у пухлину [5], де вони диференціюються у макрофаги, головним чином під впливом M-CSF. ПАМ накопичуються у ділянках пухлини, що характеризуються низьким парціальним тиском кисню [6]. Характерною і важливою подією для пухлини та організму є поляризація макрофагів у так звані M2 макрофаги за умов внутрішньопухлинної гіпоксії [7]. M2 макрофаги, які є власне ПАМ, мають виразну пропухлинну активність, стимулюючи та підтримуючи проліферацію пухлинних клітин, їх міграцію та метастазування, виживаність у гіпоксичних умовах завдяки сти-

муляції ангіогенезу, вихід з-під імунного контролю через супресію протипухлинного імунітету [8]. Пропухлинна роль ПАМ визначена для пухлин людини, при цьому продемонстрована кореляція між високим вмістом макрофагів у пухлині та несприятливим прогнозом перебігу захворювання [2, 9–12].

Серед продуктів макрофагів ідентифіковано фактори росту епідермісу EGF, TGFβ, VEGF, члени родини FGF, а також хемокіни та цитокіни. Макрофаги продукують, крім того, ферменти та інгібітори, що регулюють руйнування позаклітинного матриксу (ПМ), сприяючи таким чином інвазії та дисемінації пухлинних клітин, серед них деякі матриксні металопротеїнази (ММП), зокрема ММП-2 та -9 [13].

Відомо, що підвищена активність ММП у пухлинній тканині пов'язана з метастазуванням та несприятливим перебігом пухлинного процесу, зокрема у людини [14–24]. Слід при цьому зазначити, що клінічних досліджень із визначення щільності ПАМ та активності ММП у пухлині практично немає. Раніше нами було продемонстровано, що активність ММП-2 та -9, а також кількість ПАМ у раку шлунка (РШ) людини пов'язані з перебігом процесу, зокрема, висока активність ММП-2 у пухлині та велика кількість ПАМ асоціювалися з поганими показниками виживаності [10]. На підставі цих даних розширено пошук можливих зв'язків ММП та ПАМ з клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу і виживаністю хворих.

Розподіл хворих за клініко-патологічними характеристиками

Показник	Кількість хворих	%
<i>Стать</i>	112	100
чоловіки	75	67
жінки	37	33
<i>Вік</i>	112	100
<63	55	49
≥63	57	51
<i>Гістологічна структура</i>	112	100
аденокарцинома	66	60
слизовий рак	6	5
перснеподібно-клітинний рак	6	5
недиференційований рак	34	30
<i>Категорія pT</i>	112	100
T ₁	4	4
T ₂	20	18
T ₃	63	56
T ₄	25	22
<i>Категорія pN</i>	112	100
N ₀	54	48
N ₁	23	21
N ₂	35	31
<i>Категорія M</i>	112	100
M ₀	99	88
M ₁	13	12
<i>Стадія (pTNM)</i>	112	100
I	19	17
II	32	29
III	34	30
IV	27	24
<i>Ступінь диференціювання (pG)</i>	112	100
G ₁	4	4
G ₂	24	21
G ₃	50	45
G ₄	34	30
<i>Анатомічне розташування пухлини</i>	112	100
верхня третина	20	18
середня третина	31	28
нижня третина	56	50
тотальне ураження	5	4

Метою роботи було визначення кількості ПАМ, концентрації активних форм желатиназ у пухлинній тканині та дослідження взаємозалежності між цими показниками, їхнього зв'язку із клініко-патологічними характеристиками та виживаністю хворих на РШ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджено зразки пухлинної тканини (після-операційний матеріал) 112 хворих на первинний РШ, які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі МОЗ України з 2005 по 2011 р. Хворі не отримували перед-операційної терапії. Пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях.

Розподіл хворих за клініко-патологічними характеристиками наведено в табл. 1. За гістологічною структурою переважну більшість досліджуваних пухлин становлять аденокарциноми (60%) та недиференційований рак (30%), за ступенем диференціації — G₃ (45%), за локалізацією — пухлини нижньої третини шлунка (50%). Розподіл обстежених пацієнтів за II, III та IV стадією захворювання майже рівномірний (29; 30; 24% відповідно), дещо меншою є група хворих з I стадією (17%). Серед хворих переважають пацієнти з категоріями T₃ (56%) та M₀ (88%), з N₀ та N₁₋₂ їх майже однакова кількість (48 та 52% відповідно).

В отриманих зразках пухлинної тканини визначали концентрацію активних та латентних форм ММП-2 та -9 методом зимографії в поліакриламідному гелі (із додаванням желатину в якості субстрату) на основі SDS-електрофорезу білків [25]. 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 із ферментів (72 та 92 kDa відповідно). Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом вимірювання площі зони лізису, використовуючи для порівняння стандартний набір ММП-2 та -9 («Sigma»). Результати оцінювали за допомогою стандартної програми TotalLab 1.01.

Кількість ПАМ визначали за забарвленням продукту імуногістохімічної (ІГХ) реакції з використанням моноклональних антитіл проти CD68 (клон PG-M1, «DakoCytomation», Данія) (1:80) на парафінових зрізах пухлинної тканини шлунка. ІГХ-дослідження проводили із застосуванням детекційної системи EnVision+/HRP («DakoCytomation», Данія). В якості субстрат-хромогену використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлорид. Препарати дофарбовували гематоксиліном Мейєра. Результат ІГХ-забарвлення CD68 оцінювали напівкількісним методом. У кожному препараті налічували ≈1000 клітин і визначали відсоток CD68-позитивних клітин (CD68⁺-клітин).

Статистична обробка. Проводили статистичну обробку даних із використанням методів ва-

ріаційної статистики із застосуванням програм «STATISTICA 8.0» та «Prism 4.0». Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали, використовуючи *t*-критерій Стьюдента. Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта кореляції Спірмана (*rho*). 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

Позитивну реакцію з моноклональними антитілами, специфічними до CD68, відзначали в усіх досліджених зразках пухлини (рис. 1). Кількість ПАМ варіювала в межах від 0 до 52%, значення медіани становило 23%, середнє значення — 23,2 ± 8,7%.

Також у пухлинах усіх обстежених хворих виявляли концентрації активних форм ММП-2 та -9.

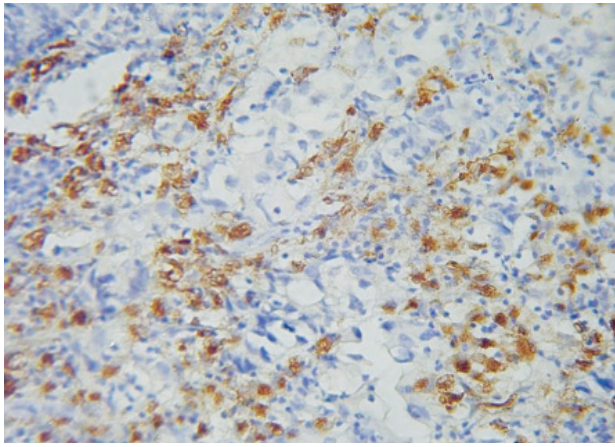


Рис. 1. CD68-позитивні клітини в тканині РШ (зб. $\times 400$)

Показники активності ММП-2 коливалися в межах $0,1 \div 52,8$ мкг/г тканини, середнє значення становило $8,2 \pm 4,9$ мкг/г тканини. Показники активності ММП-9 варіювали від $0,05$ до $28,8$ мкг/г тканини, середнє значення — $8,3 \pm 5,9$ мкг/г тканини.

Особливості зв'язку між кількістю ПАМ у пухлинній тканині та клініко-патологічними характеристиками хворих на РШ наведено в табл. 2.

Як свідчать дані (див. табл. 2), досліджені показники не відрізняються суттєво та/або достовірно залежно від статі, віку хворих та категорії Т. За гістологічною структурою найвищі значення кількості ПАМ та активності желатиназ у пухлинній тканині характерні для аденокарцином, де вміст ПАМ в 1,5 раза вищий, ніж в слизовому, та в 1,3 раза — ніж в перснеподібно-клітинному РШ ($p < 0,05$). Кількість ПАМ в пухлинах при категоріях N_{1-2} та M_1 достовірно більша ($p < 0,05$), ніж при категоріях N_0 та M_0 відповідно. Водночас між показниками концентрацій активних форм желатиназ у пухлинах при категорії N достовірної різниці не виявлено. Крім того, концентрація активної форми ММП-2 знаходиться у зворотній залежності від категорії M, тобто у хворих без метастазів концентрація активних форм ММП-2 майже в 2 рази перевищує таку у пацієнтів із метастазами ($p < 0,05$). Максимальна активація латентних форм ММП-2 в пухлинах при M_0 свідчить про значне посилення деструкції ПМ на такому етапі розвитку пухлини, коли віддалені метастази клінічно не виявлені, тобто, можливо, відбувається їх формування та/або дисемінація пухлинних клітин. Отримані результати корелюють із даними про здатність пухлини через відповідні сигнальні шляхи заздальгід створювати сприятливе мікрооточення у передметастатичних нішах [13, 26].

На IV стадії захворювання вміст ПАМ в пухлині достовірно зростає в 1,3 раза ($p < 0,05$), концентрація активної ММП-9 — в 1,7 раза (порівняно з I стадією), але різниця недостовірна ($p > 0,05$). У пухлинній тканині зі ступенем диференціації G_2 концентрація активної ММП-2 майже в 6 разів перевищує цей показник у пухлинах зі ступенем диференціації G_1 ($p < 0,05$). Що стосується анатомічної локалі-

Таблиця 2
Клініко-патологічні характеристики хворих на РШ, кількість ПАМ та концентрації активних форм ММП-2 та -9 у пухлині ($M \pm m$)

Показник	ПАМ, %	ММП-2, мкг/г тканини	ММП-9, мкг/г тканини
Стать			
чоловіки	$22,5 \pm 1,2$	$8,1 \pm 5,7$	$8,2 \pm 4,5$
жінки	$25,1 \pm 2,2$	$8,9 \pm 6,6$	$7,6 \pm 5,5$
Вік, роки			
< 63	$24,0 \pm 1,4$	$8,6 \pm 4,9$	$7,2 \pm 4,2$
≥ 63	$22,6 \pm 1,6$	$8,0 \pm 7,0$	$9,0 \pm 5,1$
Гістологічна структура пухлини			
аденокарцинома	$24,7 \pm 1,5^*$	$10,6 \pm 7,6$	$9,5 \pm 5,2$
слизовий рак	$15,6 \pm 4,0$	$5,1 \pm 2,4$	$6,9 \pm 3,1$
перснеподібно-клітинний рак	$18,7 \pm 1,8$	$6,6 \pm 2,7$	$4,1 \pm 2,0$
недиференційований рак	$22,6 \pm 1,9$	$5,1 \pm 4,8$	$6,8 \pm 4,0$
Категорія pT			
T_1	$19,0 \pm 4,0$	$6,6 \pm 4,0$	$9,1 \pm 8,9$
T_2	$21,5 \pm 2,4$	$7,4 \pm 4,6$	$7,8 \pm 4,5$
T_3	$23,9 \pm 1,7$	$8,6 \pm 5,9$	$6,6 \pm 3,9$
T_4	$24,9 \pm 1,9$	$9,3 \pm 7,7$	$11,0 \pm 6,0$
Категорія pN			
N_0	$21,32 \pm 1,5$	$7,9 \pm 5,1$	$7,0 \pm 4,5$
N_{1-2}	$25,59 \pm 1,6^*$	$8,9 \pm 7,1$	$9,5 \pm 4,9$
Категорія M			
M_0	$22,16 \pm 1,08$	$9,7 \pm 3,4$	$8,0 \pm 5,0$
M_1	$29,33 \pm 3,9^*$	$4,7 \pm 2,0^*$	$7,7 \pm 3,9$
Стадія (pTNM)			
I	$19,95 \pm 2,28$	$5,9 \pm 4,1$	$6,2 \pm 4,3$
II	$22,28 \pm 1,93$	$10,0 \pm 6,3$	$6,6 \pm 3,3$
III	$23,86 \pm 1,83$	$8,7 \pm 6,1$	$8,4 \pm 5,1$
IV	$27,01 \pm 2,84^*$	$8,3 \pm 7,2$	$11,0 \pm 6,1$
Ступінь диференціації (pG)			
G_1	$23,7 \pm 8,1$	$2,0 \pm 1,5$	$4,9 \pm 1,3$
G_2	$22,7 \pm 2,0$	$10,9 \pm 6,9^*$	$7,6 \pm 5,0$
G_3	$24,1 \pm 1,7$	$7,8 \pm 5,7$	$8,6 \pm 4,9$
G_4	$21,6 \pm 1,5$	$8,2 \pm 4,7$	$6,2 \pm 3,9$
Анатомічне розташування пухлини			
верхня третина шлунка	$29,2 \pm 4,4^*$	$13,8 \pm 9,9$	$7,9 \pm 3,7$
середня третина	$23,0 \pm 1,5$	$6,0 \pm 4,7$	$8,3 \pm 4,5$
нижня третина	$22,5 \pm 1,8$	$10,0 \pm 7,4$	$7,4 \pm 5,2$
тотальне ураження	$23,3 \pm 4,2$	$10,0 \pm 3,9$	$12,0 \pm 4,0$

* $p < 0,05$.

зації пухлини, то найбільша кількість ПАМ характерна для пухлин верхньої третини шлунка ($p < 0,05$).

Виявлено позитивну кореляцію між кількістю ПАМ та концентраціями активних форм ММП-2 та -9 в тканині РШ ($\rho = 0,4$ та $\rho = 0,51$ відповідно; $p < 0,05$) (рис. 2, 3).

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 в якості найважливішого джерела желатиназ у пухлині [27–30]. Так, в експериментах, в яких ММП-9-позитивні клітини карциноми яєчника імплантували ММП-9-«knock-out»-мишам, нестача ММП-9 в стромальних клітинах супроводжувалася зниженням макрофагальної інфільтрації пух-

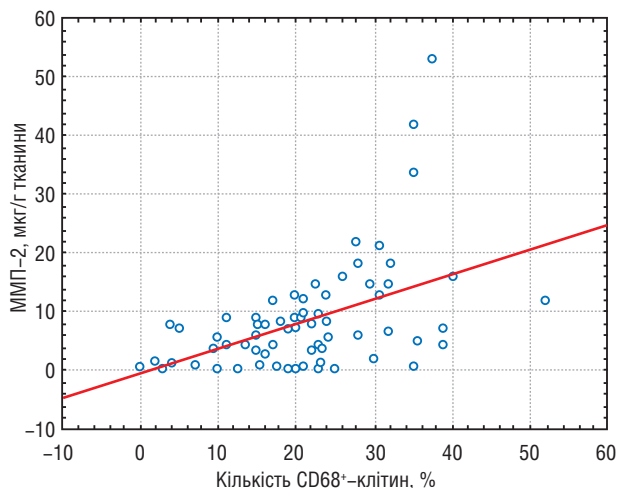


Рис. 2. Кількість CD68-позитивних клітин (кількість ПАМ) та концентрація активної ММП-2 в тканині РШ ($\rho = 0,4$; $p < 0,05$)

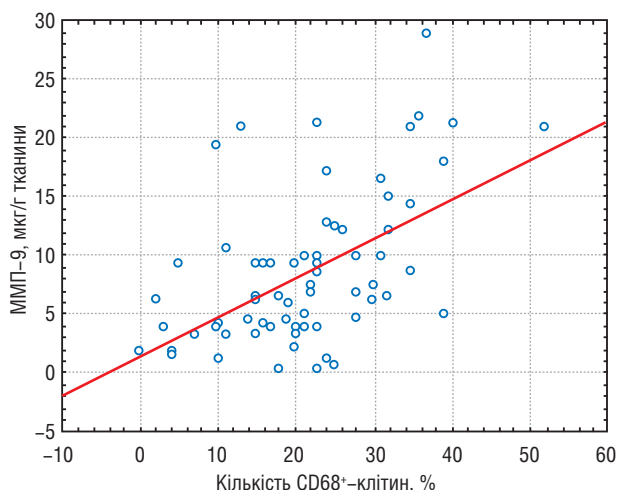


Рис. 3. Кількість CD68-позитивних клітин (кількість ПАМ) та концентрація активної ММП-9 в тканині РШ ($\rho = 0,51$; $p < 0,05$)

лин, а трансплантація кісткового мозку від ММП-9-позитивних донорів призводила до появи ММП-9-позитивних ПАМ [31]. На ММП-9-дефіцитній моделі мишей показано, що в пухлині ММП-9 продукуються пухлиноасоційованими стромальними клітинами та клітинами запалення. В моделі канцерогенезу шкіри джерелом ММП-9 у процесі розвитку пухлини виступають клітини запалення, включно з нейтрофілами, макрофагами та клітинами, похідними трансплантованих ММП-9-позитивних клітин кісткового мозку [26]. Також показано на моделі раку яєчника у ММП-9-дефіцитних мишей, що вихідний (початковий) низький рівень інфільтрації пухлин макрофагами було відновлено завдяки трансплантації селезінки від ММП-9-позитивних донорів [32]. З іншого боку, ММП, продукція яких контролюється ПАМ, самі регулюють процеси запалення. ММП полегшують рекрутування запальних клітин шляхом розщеплення медіаторів запалення. Деякі хемокини, зокрема CCL7 та CXCL12, є субстратами для ММП-2, а ММП-9 розщеплює та активує CXCL6 та CXCL8, інактивуючи

при цьому CXCL1 та CXCL4 [33]. Таким чином, желатинази не лише продукуються клітинами запалення, але й водночас виступають регуляторами запальних процесів. Результати, отримані нами, демонструють взаємозалежність між показниками активності ММП-2, -9 та кількістю CD68-позитивних клітин у РШ і збігаються із наведеними даними літератури.

Участь ПАМ в пухлинній прогресії на сьогодні підтверджується даними про кореляцію між кількістю ПАМ у пухлині та її агресивністю, зокрема з активним метастазуванням [2, 7, 29].

Проведений нами аналіз виживаності (рис. 4) показав, що тривалість життя хворих у групі з великою кількістю CD68-позитивних клітин ($> 23\%$) в пухлині вірогідно менша ($p = 0,0027$), а ризик несприятливого перебігу захворювання у 2,4 раза вищий порівняно з групою хворих, в пухлинах яких кількість CD68-позитивних клітин $< 23\%$ ($p < 0,05$).

Відомо, що продукція ММП клітинами запалення забезпечує їхню унікальну функціональну участь в пухлинному рості та ангіогенезі [27, 28, 31, 34–37]. Але ПАМ не лише продукують переважну більшість активних форм ММП в пухлині, які є визначальними для розвитку пухлини. Останні дослідження доводять, що ММП-активність ПАМ становить значну частину ММП-активності пухлинної тканини та регулює ММП-активність пухлинних клітин і таким чином як безпосередньо, так і опосередковано впливає на пухлинну прогресію [26, 33].

З іншого боку, підсумковий аналіз досліджень показує, що високі показники експресії та/або активності ММП-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14 у первинній пухлині та/або метастазах раку підшлункової залози, прямої кишки, молочної залози, меланоми, цервікальної карциноми позитивно асоційовані з пухлинною прогресією, а саме з низькою диференційованістю пухлини, високим ступенем інвазивності, несприятливим прогнозом, віддаленими метастазами, коротким терміном життя хворих [14–24].

У зв'язку з цим нами визначено залежність виживаності хворих на РШ від вмісту активних форм желатиназ у пухлині (рис. 5, 6). Показано, що пацієнти

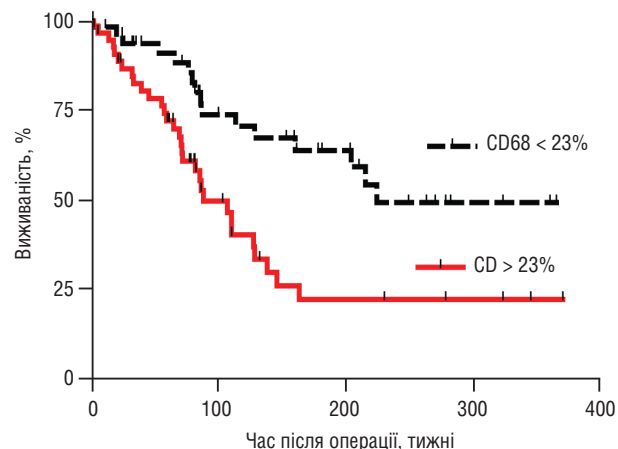


Рис. 4. Загальна виживаність хворих на РШ залежно від кількості CD68⁺-клітин (ПАМ) в пухлинній тканині

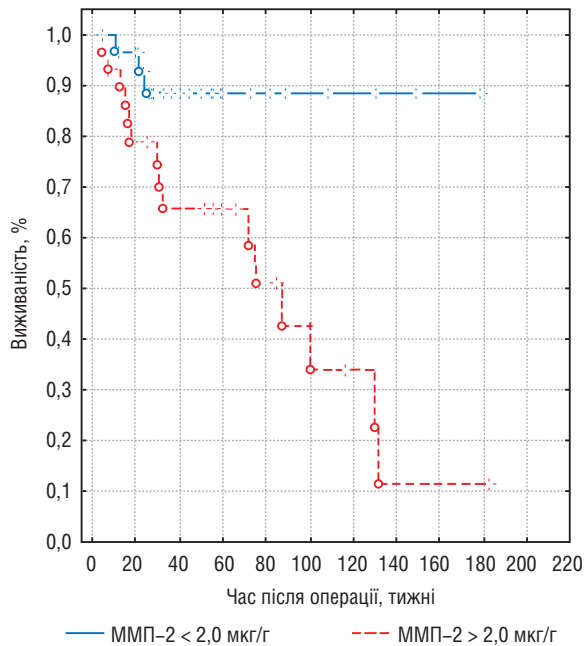


Рис. 5. Загальна виживаність хворих на РШ залежно від концентрації активної ММП-2 в пухлинній тканині ($p < 0,05$)

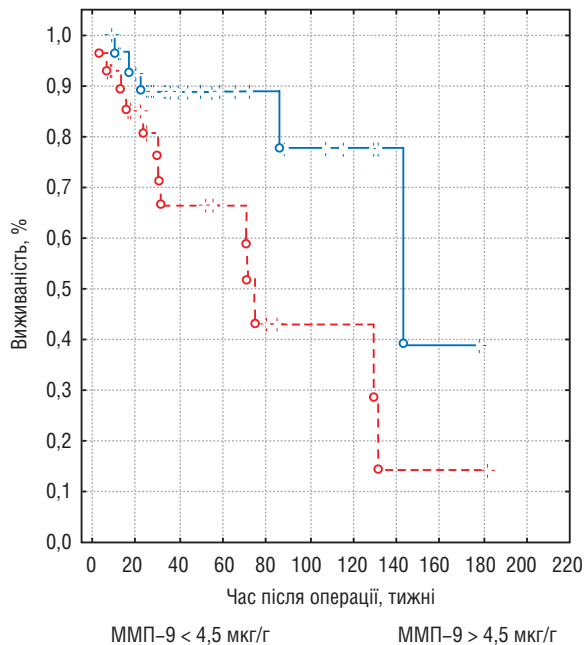


Рис. 6. Загальна виживаність хворих на РШ залежно від концентрації активної ММП-9 в пухлинній тканині ($p < 0,05$)

з концентрацією активної ММП-2 в пухлині, нижчою за 2 мкг/г, живуть достовірно довше ($p = 0,004$) та мають в 3,8 раза нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж з вищою концентрацією ($p < 0,05$). Пацієнти з концентрацією активної ММП-9 в пухлині, нижчою за 4,5 мкг/г, живуть достовірно довше ($p = 0,015$) та мають в 4,7 раза нижчий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж із вищою концентрацією ($p < 0,05$).

Таким чином, показники активності желатиназ та кількості ПАМ в пухлині корелюють не лише між собою, але й з тривалістю життя хворих на РШ.

Результати наших досліджень, з урахуванням вищенаведених даних літератури про роль ММП в механізмах запалення та метастазування, демонструють можливості використання показників кількості CD68-позитивних клітин (ПАМ) та концентрацій активних форм ММП-2 та -9 в пухлинній тканині в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ.

ВИСНОВКИ

1. Кількість ПАМ в РШ позитивно корелює із категоріями N, M та стадіями захворювання. Не виявлено залежності між концентраціями активних желатиназ у пухлині та категорією N, але вміст активної ММП-2 зворотно корелює із категорією M.

2. Виявлено пряму позитивну кореляцію між кількістю ПАМ та концентраціями активних форм ММП-2 та -9 в тканині РШ.

3. Тривалість життя хворих на РШ в групі з малою кількістю CD68-позитивних клітин ($< 23\%$) в пухлинні достовірно вища, а ризик несприятливого перебігу захворювання нижчий порівняно з групою пацієнтів, в пухлинах яких кількість CD68-позитивних клітин $> 23\%$.

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

5. Показники кількості CD68-позитивних клітин (ПАМ) та вмісту активних форм ММП-2 та -9 в пухлинній тканині можуть бути використані в контролі перебігу захворювання у пацієнтів із РШ з метою коригування протипухлинної терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Allavena P, Siva A, Solinas G, *et al.* The inflammatory microenvironment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; **66**: 1–9.
- Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 71–8.
- Mantovani A. La mala educación of tumor-associated macrophages: diverse pathways and new players. *Cancer Cell* 2010; **17**: 111–2.
- Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 540–50.
- Mantovani A, Schioppa T, Porta C, *et al.* Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; **25**: 315–22.
- Lewis C, Murdoch C. Macrophages responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005; **167**: 627–35.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, *et al.* Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 717–27.
- Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 2008; **264**: 204–15.
- Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 540–50.
- Osinsky S, Bubnovskaya L, Ganusevich I, *et al.* Hypoxia, tumor-associated macrophages, microvessel mensity, VEGF and

matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin Transl Oncol* 2011; **13**: 133–8.

11. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 2011; **167**: 211–9.

12. Medrek C, Ponten F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012; **12**: 306.

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

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

15. Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim et Biophys Acta* 2004; **1705**: 69–89.

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

17. Talvensaaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 level is prognostic in breast cancer patients. *Cancer Lett* 2005; **217**: 237–42.

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

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

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

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

22. Donadio AC, Durand S, Remedi MM, *et al.* Evaluation of stromal metalloproteinases and vascular endothelial growth factors in a spontaneous metastasis model. *Exp Mol Pathol* 2005; **79**: 259–64.

23. Hoffman UB, Eggert AA, Blass K, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res* 2003; **63**: 8221–5.

24. Shiraga M, Yano S, Yamamoto A, *et al.* Organ heterogeneity of host-derived matrix metalloproteinase expression and its involvement in multiple-organ metastasis by lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2002; **62**: 5967–73.

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

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

27. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**: 860–7.

28. van Kempen LC, Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 728–34.

29. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; **66**: 605–11.

30. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1755**: 37–69.

31. Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, *et al.* Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 1134–42.

32. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; **8**: 221–33.

33. 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.

34. Chantrain CF, Henriot P, Jodele S, *et al.* Mechanisms of pericite recruitment in tumor angiogenesis: A new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer* 2006.

35. Jodele S, Chantrain CF, Blavier L, *et al.* The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma in matrix metalloproteinase-9 dependent. *Cancer Res* 2005; **65**: 3200–8.

36. 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.

37. Ahn GO, Brown GM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell* 2008; **13**: 193–205.

TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES AND CONCENTRATION OF ACTIVE FORMS OF GELATINASES IN HUMAN GASTRIC CANCER: CORRELATION WITH SURVIVAL

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

Summary. *Tumor-associated macrophages (TAM) are the relevant factor of tumor microenvironment and source of matrix metalloproteinases (MMPs) that can destroy the extracellular matrix mediating the tumor invasion, neoangiogenesis and metastasis. Aim:* It was studied the relationship between TAM number assessed by counting of CD68 positive cells and concentration of active forms of gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in tumor tissue as well as their correlation with clinicopathologic characteristics and survival of gastric cancer patients. **Methods:** immunohistochemical, zymography. **Results:** It was determined the direct positive correlation between TAM and concentration of active forms of MMP-2 and MMP-9 in tumor. It was shown that patients with low number of TAM (CD68 positive cells number < 23%), low concentration of active forms of MMP-2 (< 2 µg/g tissue) and MMP-9 (< 4.5 µg/g tissue) in tumor have significant longer survival than patients with high value of mentioned indices. The risk of unfavorable disease outcome was higher for patients with high values of TAM number and concentration of active forms of gelatinases in tumor. **Conclusions:** It was summarized that determination of TAM number and concentration of active forms of gelatinases in gastric cancer may be helpful to evaluate the disease outcome.

Key words: tumor-associated macrophages, matrix metalloproteinases, gastric cancer, survival.

Адреса для листування:

Ганусевич І.І.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: iganus2000@yahoo.com