

Л.Д. Гуменюк¹
 Д.С. Осинський²
 Л.Н. Бубновська¹
 І.І. Ганусевич¹
 Л.А. Мамонтова¹
 А.В. Ковельська¹
 С.П. Меренцев¹
 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: рак шлунка, білок с-тус, гіпоксія, агресивність пухлини, виживаність.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ЕКСПРЕСІЇ с-МУС У ТКАНИНІ РАКУ ШЛУНКА: ЗВ'ЯЗОК ІЗ ПОКАЗНИКАМИ МІКРООТОЧЕННЯ, ДИСЕМІНОВАНИМИ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ ТА ВИЖИВАНІСТЮ

Мета: визначити наявність можливої асоціації між експресією с-тус у тканині раку шлунка, внутрішньопухлинною гіпоксією, клініко-патологічними характеристиками процесу та виживаністю хворих. **Методи:** імуногістохімічні, біохімічні, ЯМР-спектроскопія, статистичні. **Результати:** встановлено, що кількість пухлин із с-тус-позитивним ядром у клітинах становила 65,0%, із с-тус-позитивною цитоплазмою — 85,0%. Середня кількість клітин із с-тус-позитивним ядром — $23,9 \pm 1,7\%$ та з с-тус-позитивною цитоплазмою — $32,7 \pm 2,5\%$. Серед пухлин, клітини яких позитивні до с-тус за забарвленням як ядер, так і цитоплазми, превалюють аденокарциноми та пухлини із ступенем диференціації G₃. Більше с-тус-позитивних клітин за забарвленням цитоплазми виявлено у хворих із III стадією пухлинного процесу та з категорією T_x. У пухлинах, що характеризуються високим рівнем гіпоксії, зменшується кількість с-тус-позитивних клітин за цитоплазматичним забарвленням ($p < 0,02$). Встановлено зворотню кореляцію між експресією с-тус та наявністю дисемінованих пухлинних клітин у кістковому мозку ($p < 0,05$). Відзначено пряму кореляцію між кількістю клітин, позитивних до забарвлення на с-тус у цитоплазмі, та активністю ММП-9 у пухлині ($p < 0,01$). Встановлено, що виживаність хворих, пухлини яких були позитивними за ядерним забарвленням на с-тус та характеризувалися задовільною оксигенацією, була статистично достовірно гіршою, ніж така у хворих із негативними на с-тус пухлинами. **Висновки:** експресію с-тус виявляють у клітинах раку шлунка як в ядрі, так і в цитоплазмі. За умов сильної гіпоксії спостерігається пригнічення цитоплазматичної експресії с-тус; ядерна гіперекспресія с-тус за умов задовільної оксигенації асоціюється з гіршою виживаністю хворих. Отримані результати та дані доступної літератури вказують на необхідність більш детальних досліджень щодо визначення ролі с-тус у пухлинному рості через різноплановість його функціональної активності у клітині за умов оксигенації та гіпоксії.

ВСТУП

Ген с-МУС є важливим членом сімейства протоонкогенів МУС, які кодують транскрипційні фактори N-тус, с-тус та L-тус, що задіяні в регуляції проліферації та диференціювання клітин і апоптозу [1]. Ген с-МУС бере участь у низці фундаментальних функцій клітини, включаючи регуляцію клітинного росту і проліферації, метаболізму, диференціювання, апоптозу та ангіогенезу [2]. Ця багатofункціональність с-МУС стала природним чинником численних досліджень його ролі у пухлинному рості. Встановлено, що с-МУС часто гіперекспресу-

ється у пухлинах людини через генетичну реаранжировку, ампліфікацію гена та транслокації хромосом [3]. Важливими є дані, що с-тус в інтерфазних клітинах, які перебувають у стані спокою, локалізується головним чином у цитоплазмі, тоді як у клітинах, що проліферують, — у ядрі [4]. Проведено дослідження щодо пошуку асоціації між порушеннями регуляції с-МУС і злоякісними пухлинами. Активація та мутація с-МУС відзначали у пухлинах шлунка, товстого кишечника, молочної залози, легені, у множинній мієломі та клітинах лімфоми Беркітта [5, 6]. У багатьох роботах продемонстровано суттєвий зв'язок між гіперекспресією с-МУС та несприят-

ливим прогнозом перебігу захворювання при низкій пухлин, зокрема інвазивній протоковій карциномі молочної залози, остеосаркомі, але цей зв'язок не виявлено при пухлинах підшлункової та передміхурової залози [7]. Є навіть дані, що високий рівень mRNA c-MYC у клітинах раку молочної залози корелює з кращою виживаністю хворих [7]. Водночас у нещодавній публікації С. Не та співавт. [7] наведено дані щодо суттєвого підвищення експресії c-MYC у тканині раку підшлункової залози, зокрема цитоплазматичної, на пізніх стадіях процесу та при периневральній інвазії. Встановлено також, що прогноз у хворих із високим рівнем цитоплазматичної експресії c-тус був гіршим, ніж у пацієнтів із низьким рівнем цитоплазматичної експресії.

Існує небагато даних щодо функціональної ролі c-тус у перебігу раку шлунка та його прогнозі. I. Ninomiya та співавт. [8] у 23,5% хворих виявили імунореактивність клітин раку шлунка відносно c-тус, встановивши при цьому, що експресія білка у пухлині корелювала з перитонеальною дисемінацією. Автори також показали, що у хворих із c-тус-позитивними пухлинами прогноз був більш несприятливим, ніж у пацієнтів із c-тус-негативними новоутвореннями. D.A. Spondidos та співавт. [9] встановили, що клітини 55,0% пухлин шлунка були позитивними за експресією c-тус, при цьому у клітинах слизової оболонки, за винятком парієтальних клітин, експресії c-тус не виявлено. Визначено також кореляцію між підвищеною експресією c-тус і стадією процесу та глибиною інвазії. N. Onoda та співавт. [10] виявили, що рівень мРНК c-MYC був вищим у клітинах метастазів, ніж у первинній пухлині, при цьому експресія c-тус була вираженішою у пухлинах на ранніх стадіях розвитку. В іншому дослідженні у 47,4% хворих на рак шлунка зафіксовано гіперекспресію c-тус, що прямо корелювала з проліферативною активністю пухлинних клітин та поганою безрецидивною виживаністю [11]. A.G. Xu та співавт. [12], а також G.F. Yang та співавт. [13] спостерігали значно вищу експресію c-тус у клітинах раку шлунка кишечного типу, ніж дифузного. G.F. Yang та співавт. [13] і L. Kozma та співавт. [14] повідомили, що вища експресія c-тус була асоційована з наявністю метастазів. У роботі G.F. Yang та співавт. [13] також встановлено істотно вищу експресію c-тус у клітинах при розвиненому раку шлунка, ніж на ранніх стадіях росту пухлини. У дослідженнях A.N. Milne та співавт. [15] і X. Liu та співавт. [16] експресію c-тус спостерігали у 36,0 та 66,3% пухлин шлунка відповідно. Показано також, що при імуногістохімічному (ІГХ) дослідженні експресія c-тус частіше наявна в клітинах раку шлунка кишечного типу порівняно з дифузним та асоціюється з інвазивним фенотипом пухлинних клітин [17]. Цікаво, що раніше ці автори висловлювали думку, що цитоплазматична імунореактивність c-тус може бути загальною характеристикою раку шлунка дифузного типу [18]. C.R. de Souza та співавт.

[2] виявили позитивне забарвлення ядер клітин раку шлунка при визначенні білка c-тус у 76,8% випадків, при цьому частіше це було відмічено у пухлинах кишечного типу, при глибокій пенетрації пухлини та наявності віддалених метастазів. Автори зробили висновок щодо порушення регуляції експресії c-тус як ознаки несприятливого прогнозу перебігу захворювання. Базуючись на даних доступної літератури та власних результатах, L. Zhang та співавт. [1] висловили припущення, що експресія c-тус є визначальною для росту пухлинних клітин, їх виживання та підтримки злоякісного потенціалу.

Дослідження, в яких показано гальмування росту новоутворень за умов інгібіції c-тус, підтвердили цю тезу [19–21]. Водночас встановлено, що інактивація c-тус здатна призвести до втрати злоякісного фенотипу, тоді як після зняття блокади c-тус у певних випадках можна спостерігати поновлення росту пухлини [22]. C.M. Shachaf та D.W. Felsner [22] припустили, що тоді, коли інактивація c-тус може спонукати пухлину повернутися до нормального стану, деякі клітини залишають латентну здатність знову набувати злоякісних властивостей, що вказує на їх можливість існувати у стані «сплячки». Автори наводять результати досліджень на трансгенних мишах, які дозволяють зробити припущення, що інактивація онкогена c-MYC може індукувати стан пухлинної «сплячки».

Враховуючи наведені дані щодо зв'язку c-MYC із ростом пухлини та відомий стимулювальний вплив гіпоксії пухлини на її прогресію, ми поставили за мету визначити можливу асоціацію між експресією білка c-тус у тканині раку шлунка, внутрішньопухлинною гіпоксією та клініко-патологічними характеристиками процесу і виживаністю хворих.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежено 60 хворих (40 чоловіків та 20 жінок) з діагнозом «первинний рак шлунка», які лікувалися у Київському міському клінічному онкологічному центрі МОЗ України. Хворі до операції не отримували терапії. Зразки видаленої під час хірургічного втручання пухлини миттєво занурювали в рідкий азот для подальшого дослідження методом ЯМР-спектроскопії (визначення рівня гіпоксії у пухлині) і зимографії (визначення активності матриксних металопротеїназ ММП-2 і -9 у пухлині) та у формалін для проведення ІГХ дослідження. У хворих отримували також зразки кісткового мозку зі стерильної кістки для пошуку пухлинних клітин (усі зазначені методи описано раніше [23, 24]). Стадію захворювання визначали відповідно до нomenклатури TNM [26], гістологічну класифікацію пухлини — згідно з рекомендаціями ВООЗ [27]. Усі хворі були сповіщені про дослідження та дали свою згоду на використання операційного матеріалу. Клінічні характеристики хворих на рак шлунка наведено у табл. 1.

Таблиця 1
Клініко-патологічні характеристики хворих на рак шлунка

Показник	Кількість хворих, n (%)
Вік (роки), середнє, розподіл	63 (32–79)
Стать	
Чоловіки	40 (67,0)
Жінки	20 (33,0)
Локалізація пухлини	
Верхня третина шлунка	9 (15,0)
Середня третина шлунка	18 (30,0)
Нижня третина шлунка	31 (52,0)
Тотальне ураження шлунка	2 (3,0)
Гістологічна структура	
Аденокарцинома	43 (72,0)
Слизовий рак	5 (8,0)
Перснеподібно-клітинний рак	5 (8,0)
Недиференційований рак	7 (12,0)
Ступінь диференціювання	
G ₁	4 (7,0)
G ₂	13 (22,0)
G ₃	35 (58,0)
G ₄	8 (13,0)
Стадія TNM	
I	12 (20,0)
II	20 (33,0)
III	15 (25,0)
IV	13 (22,0)
Категорія pT	
1	2 (3,0)
2	12 (21,0)
3	32 (53,0)
4	14 (23,0)
Категорія pN	
N ₀	37 (61,0)
N ₁	10 (17,0)
N ₂	13 (22,0)
Віддалені метастази	
Відсутні (M ₀)	50 (83,0)
Наявні (M ₁)	10 (17,0)

Кількість с-тус-позитивних клітин у зразках тканини раку шлунка визначали ІГХ методом. Зразки тканини раку шлунка фіксували в 4% забуференому розчині нейтрального формаліну і заливали в парафін згідно зі стандартом. Парафінові зрізи товщиною 4–6 мкм були монтовані на скельця з адгезивними властивостями (SuperFrost Plus, ФРН). У день проведення ІГХ реакції здійснювали депарафінування та зневоднення зрізів. Для оптимального ІГХ визначення експресії антигену проводили демаскування антигену шляхом обробки зрізів у мікрохвильовій печі в розчині цитратного буфера рН 6,0. Усі інкубаційні цикли, передбачені при ІГХ виявленні антигену, проводили у вологій камері при кімнатній температурі. Як первинні використовували МкАТ проти білка с-тус (МкАТ миші, клон 9E10, Diagnostic BioSystems) [1:10]. Через 1 год зрізи 3 рази відмивали від незв'язаних первинних антитіл у PBS. Далі скельця зі зрізами інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хв із застосуванням як вторинних реагентів із системи PolyVueHRP Detection System Components («Diagnostic BioSystems», США). Як субстрат-хромоген використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлорид (ДАБ). Препарати дофарбовували гематоксиліном Майєра.

Візуалізацію результатів ІГХ реакції проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа Axioscop (Zeiss) при збільшенні $\times 65$, $\times 160$, $\times 400$.

Результат ІГХ забарвлення оцінювали напівкількісним методом. У кожному препараті підраховували 1000 клітин і визначали відсоток с-тус-позитивних клітин.

Статистичні аналізи виконано за допомогою пакетів прикладних програм NCSS 2000/PASS 2000 та Prism, version 4.3. Виживаність хворих визначали за методом Каплана — Мейєра, розбіжності між кривими виживаності аналізували за допомогою log-rank тесту з використанням χ^2 тесту. Статистична значущість прийнята при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що кількість пухлин із с-тус-позитивним ядром в клітинах становила 65,0% (39 пухлин) та із с-тус-позитивною цитоплазмою — 85,0% (51 пухлина). Середня кількість клітин із с-тус-позитивним ядром становила $23,9 \pm 1,7\%$ (медіана — 20, розкид 10–45%), середня кількість клітин із с-тус-позитивною цитоплазмою — $32,7 \pm 2,5\%$ (медіана — 30, розкид 10–70%). Не визначено суттєвих корелятивних зв'язків між кількістю с-тус-позитивних пухлинних клітин і клініко-патологічними характеристиками процесу (табл. 2). Водночас можна констатувати, що серед пухлин із позитивними за с-тус ядрами та цитоплазмою превалюють аденокарциноми та пухлини зі ступенем диференціації G₃. Крім того, було більше клітин із позитивним забарвленням цитоплазми у пацієнтів із III стадією захворювання та з категорією T₃ ($p < 0,05$). Ці дані співвідносяться з результатами інших досліджень, у яких показана кореляція експресії с-тус у пухлинах з глибиною пенетрації новоутворення та більш агресивним типом росту [2].

Встановлено, що кількість с-тус-позитивних клітин корелює з рівнем гіпоксії пухлини: чим сильнішою є гіпоксія, тим менше у пухлині с-тус-позитивних клітин ($r = 0,4$; $p = 0,02$). Подібний зв'язок виявлено і для клітин із с-тус-позитивною цитоплазмою. Чим більше виражена гіпоксія, тим менше клітин із с-тус-позитивною цитоплазмою ($r = 0,3$; $p = 0,02$). Однак статистично достовірний зв'язок між рівнем гіпоксії та кількістю клітин із с-тус-позитивним ядром був відсутній ($r = 0,26$; $p = 0,07$). Ці дані вказують на те, що кількість с-тус-позитивних клітин у пухлині зменшується при гіпоксії та збільшується при оксигенації, що відповідає даним щодо прямого зв'язку між експресією с-тус і проліферативною активністю пухлинних клітин [3], яка, як відомо, за умов оксигенації значно посилюється. Можна також припустити, що відома асоціація між цитоплазматичною експресією с-тус і станом «сплячки» пухлинних клітин може бути пов'язана із пристосуванням пухлинних клітин до несприятливих умов, якими є гіпоксія, та переходу до стану спокою, включаючи можливий вихід

із пухлини та переміщення до нових місць, зокрема у кістковий мозок.

Таблиця 2

c-тус-Позитивні та негативні пухлинні клітини та клініко-патологічні характеристики хворих на рак шлунка

Показник	ІГХ реакція на c-тус в ядрі, п клітин (%)		ІГХ реакція на c-тус у цитоплазмі, п клітин (%)	
	негативна (21; 35,0)	позитивна (39; 65,0)	негативна (9; 15,0)	позитивна (51; 85,0)
Гістологічна структура				
Аденокарцинома	13 (21,7)	30 (50,0)*	4 (6,8)	39 (65,0)*
Слизивий рак	1 (1,6)	4 (6,7)	0	5 (8,3)
Перснеподібно-клітинний рак	3 (5,0)	2 (3,3)	3 (5,0)	2 (3,3)
Недиференційований рак	4 (6,7)	3 (5,0)	2 (3,3)	5 (8,3)
Локалізація пухлини				
Верхня третина	4 (6,7)	5 (8,3)	2 (3,3)	7 (11,7)
Середня третина	5 (8,3)	13 (21,7)	3 (5,0)	15 (25,0)
Нижня третина	12 (20,0)	19 (31,7)	4 (6,7)	27 (45,0)
Тотальне ураження	0	2 (3,3)	0	2 (3,3)
Ступінь диференціювання				
G ₁	1 (1,7)	3 (5,0)	0	4 (6,7)
G ₂	5 (8,3)	8 (13,3)	1 (1,6)	12 (20,0)
G ₃	10 (16,7)	25 (41,7)*	5 (8,3)	30 (50,0)*
G ₄	5 (8,3)	3 (5,0)	3 (5,0)	5 (8,3)
Стадія TNM				
I	4 (6,7)	8 (13,3)	1 (1,6)	11 (18,3)
II	9 (15,0)	11 (18,3)	3 (5,0)	17 (28,3)
III	4 (6,7)	11 (18,3)	3 (5,0)	12 (20,0)*
IV	4 (6,7)	9 (15,0)	2 (3,3)	11 (18,4)
Категорія pT				
1	0	2 (3,3)	0	2 (3,3)
2	5 (8,3)	7 (11,7)	1 (1,6)	11 (18,3)
3	13 (21,7)	19 (31,7)	7 (11,7)	25 (41,7)*
4	3 (5,0)	11 (18,3)	1 (1,6)	13 (21,7)
Категорія pN				
N ₀	14 (23,4)	23 (38,4)	4 (6,7)	33 (55,0)
N ₁	2 (3,3)	8 (13,4)	1 (1,6)	9 (15,0)
N ₂	5 (8,3)	8 (13,4)	4 (6,7)	9 (15,0)
Віддалені метастази				
Відсутні (M ₀)	19 (31,6)	31 (51,7)	8 (13,4)	41 (68,3)
Наявні (M ₁)	2 (3,3)	8 (13,4)	1 (1,6)	10 (16,7)

* $p < 0,05$ порівняно з позитивними до c-тус пухлинами в ядрі та цитоплазмі у підгрупах «гістологічна структура», «ступінь диференціювання», «стадія TNM» і «категорія pT».

Узагальнюючи отримані дані, слід зазначити, що загалом експресія c-тус у пухлинах шлунка знижується на фоні зростання рівня внутрішньопухлинної гіпоксії. Це корелює з відомим фактом, що при гіпоксії зростає експресія HIF-1 α , який, як відомо, перебуває із c-тус в антагоністичних зв'язках, хоча й за умов оксигенації [28]. Однак висловлюється припущення, що у пухлинах, де спостерігається дерегуляція c-МУС, має місце співпраця HIF-1 та c-тус, спрямована на надання пухлині злоякісного фенотипу, зокрема через індукцію ферментів, що мають відношення до аеробного гліколізу [28]. Також припускають, що за гіпоксичних умов c-МУС стає частиною молекулярного шляху HIF- α -c-тус, що адаптує пухлинні клітини до гіпоксії, зміненого метаболізму, ангиогенезу та забезпечує їх виживання [2, 6]. Раніше ми продемонстрували, що при вираженій гі-

поксії у пухлинах шлунка збільшена кількість клітин, позитивних до HIF-1 α [29]; це збігається зі зниженням експресії c-тус у пухлинах при підвищенні рівня гіпоксії, що і показано у цій роботі. Слід також зазначити, що у 3,7% пухлин шлунка нами виявлено гіперекспресію HIF-1 α , при цьому всі ці пухлини були задовільно оксигеновані (PME/Pi > 2,0) [30]. Важливим виявився той факт, що виживаність хворих із пухлинами, які характеризувалися гіперекспресією HIF-1 α , була найвищою. Можливо, у такому випадку, тобто при задовільній оксигенації пухлини, можна говорити про наявність антагонізму між HIF-1 α та c-тус, експресія якого була знижена за цих умов, що втілюється у сприятливий перебіг захворювання. Цей результат певним чином збігається з даними R. Nogueira та співавт. [31], які показали, що високий рівень HIF-1 негативно корелює з розвинутою клінічною стадією нейробластоми та її васкуляризацією.

Дещо несподіваним з позицій участі c-тус у становленні агресивності пухлини виявилися наші дані щодо зв'язку між експресією c-тус та наявністю дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) у кістковому мозку. Встановлено, що ДПК виявляють у кістковому мозку у 1,5 раза рідше у хворих, у яких пухлини характеризуються наявністю c-тус-позитивних клітин (як у ядрі, так і цитоплазмі). Іншими словами, позитивна реакція клітин пухлин при визначенні c-тус співвідноситься з меншою частотою пухлинних клітин у кістковому мозку.

Певним підтвердженням цього висновку може слугувати виявлення прямої кореляції між кількістю пухлинних клітин із c-тус-позитивною цитоплазмою і активністю ММП-9 у тканині новоутворення: кількість таких клітин збільшується на фоні зростання активності ММП-9 ($r = 0,41$; $p = 0,01$). Інші зв'язки c-тус-позитивності в усіх варіантах, як з активністю ММП-9, так і з ММП-2, виявилися статистично недостовірними. Отримані дані щодо прямої кореляції між c-тус-позитивними клітинами та активністю ММП-9 у зв'язку з наведеними вище даними щодо відсутності асоціації між c-тус-позитивними клітинами у пухлині та ДПК можна пояснити тим, що клітини з експресією c-тус у цитоплазмі вважають неактивними, іншими словами «сплячими». У цьому випадку, незважаючи на підвищення активності ММП-9, яке має ремоделювати позаклітинний матрикс і сприяти виходу пухлинних клітин у циркуляцію, пухлинні клітини з цитоплазматичною експресією c-тус залишаються у пухлині у «сплячому», непроліферативному стані та не потрапляють у кістковий мозок. Зазначимо, що механізми цих взаємозв'язків слід вивчити більш детально.

Проведено аналіз зв'язку між виживаністю хворих та кількістю c-тус-позитивних клітин у пухлині. Встановлено, що виживаність пацієнтів із пухлинами, що характеризуються помірною гіпоксією, та наявністю клітин із c-тус-позитивними ядрами була

статистично суттєво гірша за таку хворих із с-тус-негативними ядрами ($\chi^2 = 4,110$; $p = 0,0426$) (рис. 1). Дані, що вказують на прямий зв'язок експресії с-тус у ядрі пухлинних клітин із несприятливим перебігом захворювання, підтверджуються тим фактом, що виживаність хворих із пухлинами, у яких кількість с-тус-позитивних ядер була вищою за значення медіани, гірша, ніж виживаність хворих із пухлинами, в яких кількість с-тус-позитивних ядер була меншою за медіану ($\chi^2 = 3,719$; $p = 0,05$) (рис. 2). Слід відмітити, що зв'язки між виживаністю хворих і кількістю клітин із с-тус-позитивною цитоплазмою виявилися статистично недостовірними ($p > 0,05$). Не встановлено також достовірної кореляції між експресією с-тус та виживаністю хворих із пухлинами у стані сильної гіпоксії.

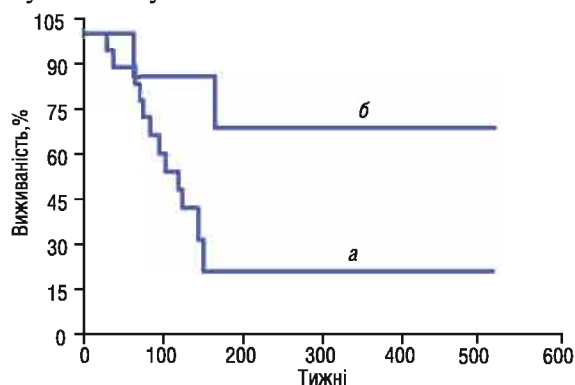


Рис. 1. Загальна виживаність (оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест, $\chi^2 = 4,110$, $p = 0,0426$) хворих на рак шлунка, пухлини яких позитивні (а) та негативні (б) за експресією с-тус у ядрі

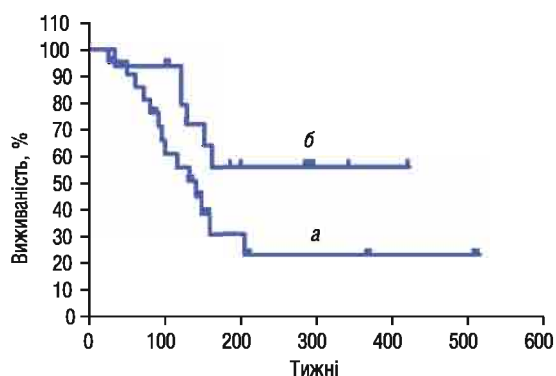


Рис. 2. Загальна виживаність (оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест, $\chi^2 = 3,719$, $p = 0,05$) хворих на рак шлунка. Розподіл пухлин проведено відносно медіани кількості позитивних клітин за ядерним забарвленням (медіана = 20%; а — більше медіани; б — менше медіани)

Обговорюючи отримані дані у контексті ролі с-тус у пухлинній прогресії та значення встановлення експресії с-тус у пухлинних клітинах людини для прогнозу, слід звернутися до відомих фактів. Продемонстровано, що домінуюча локалізація с-тус спостерігається в інтерфазних клітинах у стані спокою, тоді як проліферуючі клітини демонструють ядерну локалізацію с-тус [4, 32]. Відомо, що інактивна с-тус призводить до пригнічення росту пухлини та формування стану спокою [33]. Водночас

показано, що найкраща виживаність при раку яєчника була у хворих, пухлини яких виявилися негативними за р53 та позитивними за р27 і с-тус [34]. Ці дані дещо суперечать результатам багатьох досліджень, в яких чітко доведено, що гіперекспресія с-тус притаманна багатьом агресивним пухлинам людини, та які стали основою рекомендацій щодо створення протипухлинних засобів, мішенню яких має бути с-тус [32]. Показано, що с-тус перш за все є фактором, який сприяє активному росту та прогресії пухлини [32, 35, 36]. Однак встановлення функціонального значення с-тус для пухлинного росту потребує подальших досліджень [6].

Отримані нами результати чітко свідчать, що експресія с-тус тісно пов'язана з рівнем гіпоксії у пухлині. При зростанні рівня гіпоксії експресія с-тус у пухлинних клітинах пригнічується. Ці дані підтверджують результати роботи [35], в якій показано, що за умов гіпоксії та нестачі глюкози відбувається пригнічення експресії с-тус, яке може супроводжуватися адаптацією клітин до несприятливих умов та переходом їх у стан спокою, в якому вони переживають несприятливі умови існування [22, 33].

Слід також констатувати, що роль білка с-тус у пухлинах складна і вирішення цього питання є актуальним. З одного боку, гіперекспресія с-тус стимулює ріст пухлини та її агресивність, з іншого, за певних умов, перш за все гіпоксії, відбувається пригнічення с-тус, що супроводжується формуванням стану спокою, який буде захищати пухлинні клітини як від несприятливих умов мікрооточення, так і, вірогідно, від цитостатичних агентів.

Можна припустити, що прогностичне значення експресії с-тус у пухлинах слід розглядати у комплексі з іншими показниками як біологічного профілю новоутворення, так і мікрооточення пухлинних клітин. За умов «сильної» гіпоксії у тканині раку шлунка рівень с-тус-позитивних клітин як за показниками ядерного, так і цитоплазматичного забарвлення не має вагомого прогностичного значення. Однак за умов задовільної оксигенації, що вказує на сприятливий прогноз, перш за все з позицій чутливості пухлинних клітин до цитостатичних засобів, високий рівень клітин із с-тус-позитивними ядрами може бути фактором несприятливого прогнозу перебігу захворювання.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на рак шлунка кількість пухлин із с-тус-позитивним ядром у клітинах становила 65,0%, із с-тус позитивною цитоплазмою — 85,0%. Середня кількість клітин із с-тус-позитивним ядром — $23,9 \pm 1,7\%$ та з с-тус-позитивною цитоплазмою — $32,7 \pm 2,5\%$ (медіана — 30%, розкид 10–70%). Серед пухлин, клітини яких позитивні до с-тус як за забарвленням ядер, так і цитоплазми, превалюють аденокарциноми та пухлини зі ступенем диференціювання G₃. Більше клітин, позитивних до с-тус за забарвленням цитоплазми, вияв-

лено у хворих із III стадією захворювання та з категорією T₃.

2. У пухлинах, що характеризуються високим рівнем гіпоксії, зменшується кількість c-мус-позитивних клітин.

3. Спостерігається зворотня кореляція між експресією c-мус та наявністю ДПК у кістковому мозку.

4. Встановлено пряму кореляцію між експресією c-мус у пухлині та активністю ММП-9.

5. Виживаність хворих, пухлини яких були позитивними за ядерним забарвленням на c-мус та характеризувалися задовільною оксигенацією, була статистично достовірно гіршою, ніж така у пацієнтів із негативними за c-мус пухлинами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Zhang L, Hou Y, Ashktorab H, *et al.* The impact of C-MYC gene expression on gastric cancer cell. *Mol Cell Biochem* 2010; **344**: 125–35.

2. Souza de CR, Leal MF, Calcagno D, *et al.* MYC deregulation in gastric cancer and its clinicopathological implications. *PLoS One* 2013; **8**: e64420.

3. Huang LE. Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Different* 2008; **15**: 672–7.

4. Soldani C, Bottone MG, Biggiogera M, *et al.* Nuclear localization of phosphorylated c-Myc protein in human tumor cells. *Eur J Histochem* 2002; **46**: 377–80.

5. Calcagno DQ, Leal MF, Assumpcao PP, *et al.* MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 5962–8.

6. Podar K, Anderson KC. A therapeutic role for targeting c-Myc/HIF-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* 2010; **9**: 1722–8.

7. He C, Jiang H, Geng S, *et al.* Expression and prognostic value of c-Myc and Fas (CD95/APO1) in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; **7**: 742–50.

8. Ninomiya I, Yonemura Y, Matsumoto H, *et al.* Expression of c-myc gene product in gastric carcinoma. *Oncology* 1991; **48**: 149–53.

9. Spandidos DA, Karayiannis M, Yiagnis M, *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of the c-myc oncoprotein in human stomach cancers. *Digestion* 1991; **50**: 127–34.

10. Onoda N, Maeda K, Chung YS, *et al.* Overexpression of c-myc messenger RNA in primary and metastatic lesions of carcinoma of the stomach. *J Am Coll Surg* 1996; **182**: 55–9.

11. Han S, Kim H-Y, Lark K, *et al.* C-myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Korean Mol Sci* 1999; **14**: 526–30.

12. Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; **7**: 403–6.

13. Yang GF, Deng CS, Xiong YY, *et al.* Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 491–6.

14. Kozma L, Kiss I, Hajdu J, *et al.* C-myc amplification and cluster analysis in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2001; **21**: 707–10.

15. Milne AN, Sitarz R, Carvalho R, *et al.* Early onset gastric cancer: on the road to unraveling gastric carcinogenesis. *Curr Mol Med* 2007; **7**: 15–28.

16. Liu X, Yu H, Cai H, Wang Y. Expression of CD24, p21, p53, and c-myc in alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: correlation with clinicopathologic characteristics and survival. *J Surg Oncol* 2014; **109**: 859–64.

17. Calcagno DQ, Freitas VM, Leal MF, *et al.* MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. *BMC Gastroenterology* 2013; **13**: 141.

18. Calcagno DQ, Guimarães AC, Leal MF, *et al.* MYC insertions in diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2009; **29**: 2479–84.

19. Wang Y-H, Liu S, Zhang G, *et al.* Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res* 2005; **7**: R220–8.

20. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; **146**: 904–7.

21. Soucek L, Whitfield JR, Sodik NM, *et al.* Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes Dev* 2013; **27**: 504–13.

22. Shachaf CM, Felsher DW. Tumor dormancy and MYC inactivation: pushing cancer to the brink of normalcy. *Cancer Res* 2005; **65**: 4471–4.

23. Бубновська ЛМ, Ковельська АВ, Болдескул ІЄ та ін. Рівень гіпоксії у тканині раку шлунка та перебіг захворювання. *Онкологія* 2009; **11**: 39–44.

24. 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 ID582140, 7 p.

25. 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**: 133–8.

26. International Union Against Cancer, TNM Classification of Malignant Tumors / Ed. by L.H. Sobin and C. Wittekind. New York, Wiley-Liss, 6th ed. 2002.

27. Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, *et al.* Gastric carcinoma, in World Health Organization Classification of Tumors. Tumours of the Stomach / Ed. by S.R. Hamilton, L.A. Aaltonen. IARC Press, Lyon, France, 2000; **3**, Ch. 3: 39–52.

28. Dang CV, Kim J-W, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 51–6.

29. Осинский СП, Гуменюк ЛД, Осинский ДС, Меренцев СП. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора-1 α в ткани рака желудка человека и ее связь с некоторыми клиническими характеристиками заболевания. *Онкология* 2006; **8**: 33–7.

30. Гуменюк ЛД. Гіпоксія-індукований фактор (HIF-1 α) і гіпоксія-асоційовані процеси у раку шлунка та їх зв'язок з пухлинним ростом. Автореф дис ... канд біол наук. Київ: Інст експ патол онкол радіобіол ім. Р.Є. Кавецького. 2011. 20 с.

31. Noguera R, Fredlund E, Piqueras M, *et al.* HIF-1 α and HIF-2 α are differentially regulated *in vivo* in neuroblastoma: high HIF-1 α correlates negatively to advanced clinical stage and tumor vascularization. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 7130–6.

32. Lin C-P, Liu C-R, Lee C-N, *et al.* Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatology* 2010; **2**: 16–20.

33. Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, *et al.* MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumor dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; **431**: 1112–5.

34. Skirnisdóttir IA, Sorbe B, Lindborg K, Seidal T. Prognostic impact of p53, p27, and C-MYC on clinicopathological features and outcome in early-stage (FIGO I–II) epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011; **21**: 236–44.

35. Okuyama H, Endo H, Akashika T, *et al.* Downregulation of c-MYC protein levels contributes to cancer cell survival under dual deficiency of oxygen and glucose. *Cancer Res* 2010; **70**: 10213–23.

36. Larsson L-G, Henriksson MA. The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res* 2010; **316**: 1429–37.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF c-MYC EXPRESSION IN GASTRIC CANCER TISSUE: ASSOCIATION WITH MICROENVIRONMENT INDICES, DISSEMINATED TUMOR CELLS AND SURVIVAL

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

Summary. *Aim:* to determine the possible association between c-myc expression in gastric cancer, intratumoral hypoxia and clinicopathological characteristics and patients survival. **Methods:** immunohistochemical, biochemical, NMR spectroscopy, statistical. **Results:** it was shown that the number of tumors with c-myc positive nucleus in cells was 65.0% and with c-myc positive cytoplasm — 85.0%. The mean number of cells with c-myc-positive nucleus was $23.9 \pm 1.7\%$ and with c-myc-positive cytoplasm — $32.7 \pm 2.5\%$. Among the tumors with cells that were positive to c-myc both by nuclear staining and cytoplasmic staining dominate the adenocarcinoms and tumors with G₃ grade of differentiation. More c-myc positive tumors with cytoplasmic staining were observed in patients in stage III and T₃ category. The number of c-myc positive cells with cytoplasmic staining was decreased in tumors that were characterized by high level of hypoxia ($p < 0.02$). The inverse correlation was shown between c-myc expression and disseminated tu-

mor cells in bone marrow ($p < 0.05$). The direct correlation was observed between the number of c-myc positive cells with cytoplasmic staining and MMP-9 activity in tumor ($p < 0.01$). It was determined that overall survival of patients with tumors that were c-myc positive with nuclear staining and characterized by weak hypoxia (satisfactory oxygenation) was statistically significant poorer than that of patients with c-myc negative tumors. **Conclusion:** c-myc expression is detected in gastric cancer cells both in nucleus and cytoplasm; the inhibition of cytoplasmic expression of c-myc under strong hypoxia was observed; nuclear overexpression of c-myc under weak hypoxia (satisfactory oxygenation) is associated with poorer overall survival; obtained results and literature data indicate the necessity to perform the more detailed studies to evaluate the role of c-myc in tumor growth due to multifunctional activity of c-myc in cells under oxygenation and hypoxia.

Key Words: gastric cancer, c-myc protein, hypoxia, tumor aggressiveness, survival.

Адреса для листування:

Гуменюк Л.Д.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Одержано: 12.11.2014