

УДК 616-[006:076+08]:615.37

Л. В. Бовкун, І. Є. Соколова, Л. Д. Гуменюк

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького*

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ МАКРОФАГІВ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА

Установлено пряму кореляцію між кількістю пухлино-асоційованих макрофагів (ПAM) і кількістю метастазів у хворих на рак шлунка, а також зворотну залежність тривалості життя хворих від рівня ПAM. Визначення кількості пухлино-асоційованих макрофагів проведено на парафінових зрізах тканин раку шлунка від 37 хворих імуногістохімічним методом, із використанням моноклональних антитіл до CD₆₈. Високий рівень ПAM – фактор несприятливого прогнозу перебігу захворювання, що спричинює зниження виживаності хворих.

Л. В. Бовкун, І. Є. Соколова, Л. Д. Гуменюк

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ОПУХОЛЕ-АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Установлена прямая корреляция между количеством опухоли-ассоциированных макрофагов (ОAM) и количеством метастазов у больных раком желудка, а также обратная зависимость продолжительности жизни больных от уровня ОAM. Определение количества опухоли-ассоциированных макрофагов проведено на парафиновых срезах тканей рака желудка от 37 больных иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител к CD₆₈. Высокий уровень ОAM является фактором неблагоприятного прогноза течения заболевания, что ведет к снижению выживаемости больных.

L. V. Bovkun, I. E. Sokolova, L. D. Gumenyuk

*Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University
R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology*

DETERMINATION OF THE NUMBER OF TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

A direct correlation of tumour-associated macrophages (TAM) quantity and formation of metastasis in patients with gastric cancer was shown. Also the inverse relationship of life span and TAM quantity was determined. The studies were conducted on tumour tissue samples obtained from 37 operated patients. Quantity of TAM (%) in tumour tissues of patients with gastric cancer was determined by immunohistochemistry on paraffin sections. We used CD68 as the monoclonal antibodies. It was found that a high TAM level is a factor of unfavourable prognosis for a disease.

Вступ

У наш час на перший план виходять проблеми, пов'язані зі збереженням навколишнього середовища та здоров'я людей [6]. Щорічно у світі синтезуються тисячі но-

вих хімічних речовин, у тому числі з мутагенною та канцерогенною дією. У багатьох регіонах планети погіршився епідеміологічний стан, активізувалися відомі та з'явилися нові, дуже важкі за перебігом, інфекційні хвороби [10]. Всі ці фактори можуть спричинювати виникнення раку та впливати на його поширення у світі. За прогнозами американських учених, уже у перших десятиріччях XXI ст. від раку помиратиме кожна третя людина [1; 11].

Серед різних за локалізацією форм раку рак шлунка – друга за кількістю причин смерті після раку легень (у чоловіків) і раку грудної залози (у жінок) [4]. Незважаючи на значні успіхи теоретичної та практичної онкології, залишається багато нез'ясованого у проблемі раку шлунка. Кількість осіб із цією патологією на 100 тис. населення в Росії досягає 41, в Японії – 59, Фінляндії – 49, США – 7,2 хворих. Захворюваність на рак шлунка в Україні у 2002 р. складала 35 осіб на 100 тис. населення [7; 14].

За останні роки з'явилися чіткі докази двозначності дії макрофагів у пухлинній прогресії та інвазії. Тоді як одна популяція макрофагів може фагоцитувати ракову клітину, інша сприяє розвитку та розмноженню ракових клітин [13]. Саме таку популяцію макрофагів назвали «пухлино-асоційовані макрофаги» (ПАМ, tumor-associated macrophages) [2; 3]. Вони накопичуються у гіпоксичних зонах, складають більшу частину лейкоцитарного інфільтрату пухлини та мають як про-, так і антипухлинні властивості.

Щоб підтвердити роль ПАМ, провели ряд досліджень для виявлення взаємозв'язку між кількістю пухлино-асоційованих макрофагів у хворих на рак шлунка, наявністю метастазів у регіонарних лімфовузлах і виживаністю хворих [8; 9].

Дані, викладені в цій статті, показують, що макрофаги, поряд з активною участю у протипухлинному захисті, здатні стимулювати ріст пухлини. Таку їх дію деякі автори схильні називати парадоксальною. Потребує відповіді питання: чим саме детермінована неоднозначність впливу макрофагів на ріст пухлини?

Мета цієї роботи – визначити кількість і локалізацію пухлино-асоційованих макрофагів у хворих на рак шлунка, а також визначити фагоцитарну активність гранулоцитів у хворих із хелікобактерною інфекцією та у хворих на рак шлунка.

Матеріал і методи досліджень

Роботу виконано на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ) та Інституту гастроентерології АМН України (Дніпропетровськ).

Як об'єкти дослідження використовували 37 зразків пухлинних тканин, отриманих у ході операцій, проведених із метою видалення пухлин при первинному раку шлунка. Донори пухлинних тканин проходили лікування в Міській онкологічній лікарні МОЗ України (Київ). Отримані зразки зберігали як архівний матеріал в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Хворі не проходили курсу лікування до операції. Пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях.

Перший етап дослідження – приготування гістологічних препаратів.

Робота із гістологічним матеріалом. Для морфологічного диференціювання пухлинної тканини шлунка післяопераційні зразки тканин (10 x 10 x 3 мм) фіксували в 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну, зневоднювали в етанолі у серії розчинів зростаючої концентрації від 50 до 96 %, переносили у суміш спирту (96 %) із хлороформом (1:1), тричі промивали чистим хлороформом, поміщали у блочки з роз-

плавленим парафіном (54–55 °С). Для отримання ультратонких зрізів тканину нарізали товщиною 4–6 мкм на мікромомі та фіксували її на предметному склі [9; 12].

Імуногістохімічний метод. Скельця з препаратами тканин фіксували у ксилолі та спирті, блокували пероксидазу 3 % розчином H_2O_2 [8; 9]. На скельце наносили 3 % розчин бичачого сироваткового альбуміну (BSA), моноклональні антитіла до CD₆₈, Labelled polymer HRP Anti-mouse і діаміно-бензидин (DAB) [9; 13]. Після цього скельця опускали в дистильовану воду для припинення реакції; 2–3 хв фарбували гематоксиліном Майєра. Щоб зріз був прозорішим, знову скельце поміщали у спирт і ксилол. Після цього за допомогою люмінесцентного мікроскопа підраховували кількість клітин, які забарвлювались завдяки реакції «антиген – антитіло», на 1 000 клітин препарату. У даному випадку це й були пухлино-асоційовані макрофаги. Їх кількість виражали у відсотках до загальної кількості макрофагів [9; 12]. Відповідно до значення медіани CD₆₈-позитивних клітин (23 %) умовно поділяли показники кількості пухлино-асоційованих макрофагів (ПАМ) на низькі та високі [13; 15].

Після визначення ролі популяції пухлино-асоційованих макрофагів у пухлинному процесі досліджено активність нейтрофілів при малігнізації епітеліальних клітин шлунка. Нейтрофіли – наймасовіша популяція лейкоцитів і найактивніші клітини, здатні до фагоцитозу. Для цього ставили НСТ-тест.

Методика проведення НСТ-тесту. Приготування робочого реактиву для НСТ проводили таким чином: до 0,2 мл 0,2 М $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ додають 0,8 мл 0,2 М $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$. До цього розчину додають 2 мг нітросинього тетразолію. До краплі дослідної крові з гепарином на предметному склі додавали краплю робочого реактиву для НСТ. Перемішували скляною паличкою та поміщали в термостат при +37 °С на 45 хв у вологій камері (чашка Петрі з вологим бинтом). Після цього, зробивши тонкий НСТ-мазок, фіксували його в 96 % спирті 5 с [13]. Далі фарбували мазок у розчині сафраніну 0,5 % (3 хв), змивали дистиллятом і опускали скельце з дослідним зразком у брильянтовий зелений на 20 с. Знову змивали дистиллятом. Мікроскопували мазок під імерсією при збільшенні 100 × 10. Оцінювали реакцію за кількістю НСТ-позитивних клітин, підраховуючи відсоток нейтрофілів, які містять диформази. За кількістю диформазану, що відклався в клітині, обчислювали цитотоксичний показник активності нейтрофілів (ЦПА), проводили візуальну оцінку кількості гранул диформазану в нейтрофілах із використанням принципу L. S. Karlow за формулою:

$$\text{ЦПА} = \frac{(0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d)}{100},$$

де a, b, c, d – кількість клітин відповідно 0, 1, 2 та 3-го ступеня заповнення клітини гранулами диформазану. У нормі значення НСТ-тесту не повинно перевищувати 12 %, а значення ЦПА – 0,3–0,8. Невідповідність цих показників, передбачених нормою, дозволяє говорити про порушення функціонування організму та про патологію [13].

Результати та їх обговорення

Позитивна реакція з моноклональними антитілами, специфічними до CD₆₈-антигену, спостерігалась у всіх досліджених зразках. Характерна картина наведена на рисунку 1. Залежно від конкретного зразка кількість пухлино-асоційованих макрофагів (ПАМ) у тканині раку шлунка варіювала в межах від 2 до 63 %. Проведено статистичну обробку даних і отримано значення медіани (визначено шляхом знаходження середнього показника варіаційного ряду) – 23 %, середнє арифметичне – $23,6 \pm 1,4$ %.

Пацієнтів, хворих на рак шлунка, поділили на дві категорії. До першої категорії N_0 увійшли хворі без метастазів у регіонарних лімфовузлах, а до другої категорії $N_{1,2}$ –

пацієнти з метастазами в лімфовузлах (аналізи надходили до лабораторії без конкретного надання інформації про групу метастазованих лімфовузлів). У таблиці 1 наведено дані залежності кількості ПАМ від наявності метастазування у хворих різних категорій, поділених згідно з патоморфологічною класифікацією раку шлунка (pTNM).

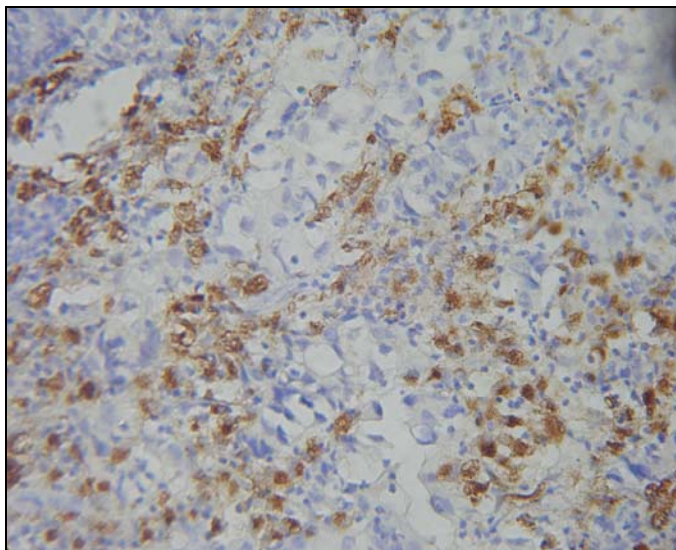


Рис 1. Пухлино-асоційовані макрофаги у тканині раку шлунка (x 400):
за допомогою діамінобензидину (DAB), що осідає на поверхні імунного комплексу
«пухлино-асоційований макрофаг + моноклональне антитіло проти CD₆₈»
утворюється продукт, що набуває коричневого забарвлення

Таблиця 1

**Кількість пухлино-асоційованих макрофагів (ПАМ)
у пухлинній тканині хворих на рак шлунка за категорією N (%)**

pN категорія	Кількість ПАМ у пухлинній тканині	
	середнє значення, %	медіана, %
N ₀ (відсутні метастази)	22,8 ± 1,7	23,0
N _{1,2} (наявні метастази)	24,7 ± 1,4*	23,0

Примітка: * $p < 0,01$.

Середнє значення кількості ПАМ у хворих без метастазування у регіонарних лімфатичних вузлах дещо менше, ніж у хворих із метастазами в лімфовузлах. Це може свідчити, що вищий ступінь розвитку пухлини зумовлює більше пригнічення імунної системи та активацію проліферації та розвитку ПАМ, що сприяє метастазуванню пухлин у регіонарні лімфатичні вузли.

Спостерігалася статистично достовірною ($p < 0,01$) позитивна кореляція між рівнем ПАМ у пухлинній тканині та наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах хворих на рак шлунка (табл. 2). За відсутності метастазів у регіонарних лімфовузлах кількість хворих із низьким і високим рівнем ПАМ у пухлині становила 66 та 34 %, відповідно. За наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах це співвідношення змінювалось: кількість хворих із низьким і високим рівнем ПАМ у пухлині становила 32 та 68 %, відповідно. Це говорить про значний вплив макрофагів даної популяції на розвиток пухлинного процесу.

Проведено ретроспективний аналіз зв'язку між тривалістю життя хворих на рак шлунка та кількістю ПАМ у пухлинній тканині (рис. 2). При цьому пацієнтів поділено на дві групи. До першої групи увійшли хворі, у яких кількість ПАМ (див. табл. 1) була нижчою за медіану (< 23 %). У другій групі кількість ПАМ перевищувала значення медіани (> 23 %). Тривалість життя хворих другої категорії, у пухлинах яких визначено високу кількість ПАМ, вірогідно ($p < 0,01$) менша, ніж у першій групі хворих із низькою кількістю ПАМ. Смертність у другій групі хворих удвічі більша порівняно з групою хворих із низьким показником ПАМ.

Таблиця 2

Зв'язок між кількістю ПАМ у тканині раку шлунка та наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах

Метастази в регіонарних лімфатичних вузлах (категорія N)	Кількість хворих (%) із різними рівнями пухлино-асоційованих макрофагів у пухлинній тканині	
	низький рівень ПАМ	високий рівень ПАМ
N ₀ (відсутні метастази)	66	34
N _{1,2} (наявні метастази)	32	68

Підсумовуючи, слід зазначити, що спостерігається пряма кореляція між рівнем ПАМ у пухлинній тканині та наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах і зворотна залежність тривалості життя хворих на рак шлунка від рівня ПАМ. Таким чином, високий рівень ПАМ – фактор несприятливого прогнозу перебігу захворювання.

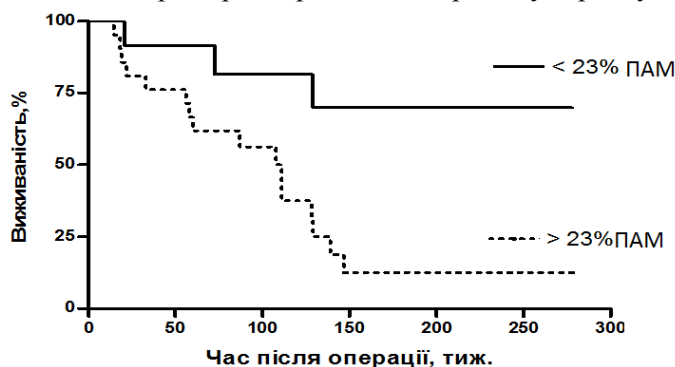


Рис. 2. Вживаність у групах хворих на рак шлунка із різною кількістю ПАМ у пухлинній тканині (CD₆₈+клітини)

Після визначення ролі популяції пухлино-асоційованих макрофагів у пухлинному процесі стало цікавим дослідити, як змінюється активність ще одного фактора фагоцитозу – нейтрофілів – при малігнізації епітеліальних клітин шлунка. Нами проведено дослідження зв'язку фагоцитарної активності нейтрофілів з інвазією в організмі людини бактерії *Helicobacter pylori*. У процесі своєї життєдіяльності вона викликає запалення та появу виразки шлунка.

Під нашим спостереженням перебували 9 пацієнтів із хелікобактерною інфекцією, які стаціонарно лікувалися в Інституті гастроентерології АМН України (Дніпропетровськ) і 9 пацієнтів, хворих на первинний рак шлунка, які проходили лікування в Міській онкологічній лікарні МОЗ України (Київ). Як контроль використовували показники фагоцитарної активності нейтрофілів 9 здорових людей. Хворі на рак не проходили курсу лікування до операції.

При первинній інвазії *H. pylori* у підслизові шари шлунка імунна система намагається знищити збудника, тому й підвищується фагоцитарна активність і цитотоксичний показник активності нейтрофілів (табл. 3). Із загальної кількості клітин із поглинутими частками диформазану відсоток НСТ-позитивних нейтрофілів складає у хворих із хелікобактерною інфекцією $26,11 \pm 2,32$, що значно вище, ніж у контролі ($10,0 \pm 1,83$), і суттєво перевищує ці показники у хворих на рак шлунка ($5,66 \pm 0,87$).

Таблиця 3

**Показники фагоцитарної активності нейтрофілів
у хворих на рак шлунка та з хелікобактерною інфекцією**

Захворювання	Показники фагоцитарної активності нейтрофілів	
	НСТ*	ЦПА**
Виразкова хвороба із хелікобактерною інфекцією	$26,11 \pm 2,32$	$0,33 \pm 0,04$
Рак шлунка	$5,66 \pm 0,87$	$0,07 \pm 0,01$
Здорові люди	$10,0 \pm 1,83$	$0,17 \pm 0,06$

Примітки: НСТ* – тест відновлення нітросинового тетразолію, який характеризує здатність нейтрофілів до кисень-залежного клінінгу; ЦПА** – цитотоксичний показник активності нейтрофілів, підвищення якого вказує на наявність інфекційного процесу в організмі.

Бактерія при цьому руйнує клітини слизової оболонки, викликаючи надмірне виділення соляної кислоти та пепсину, що викликає запалення та ріст виразки. Знижується стійкість імунітету та фагоцитарна здатність нейтрофілів, простежується виснаження імунної системи. *H. pylori* починає проникати все глибше у підслизові шари, нейтрофіли туди вже майже не проникають і хронізація сприяє вже малігнізації. Продукти, що секретуються пухлинними тканинами, регулюють міграцію моноцитів із судинного русла та сприяють їх подальшій трансформації у дві популяції макрофагів M_1 і M_2 . Одна популяція (M_1) при цьому пригнічує розвиток і проліферацію пухлини, а інша (M_2 , ПАМ) стимулює її до розвитку та подальшої малігнізації. ПАМ посилюють пухлинний ріст у культуральних умовах і метастазування злоякісних пухлин у системі *in vivo* та полегшують інвазію пухлинних клітин. Ці властивості орієнтовані не на захист організму проти пухлини, а навпаки – на підтримання пухлинної прогресії та захист новоутворення від механізмів природного протипухлинного впливу організму. Вони залучаються до формування резистентності раку до дії факторів, що індукують апоптоз.

Висновки

Установлено взаємозв'язок між кількістю ПАМ у тканинах хворих на рак шлунка та розвитком пухлини. Кількість ПАМ у хворих із метастазами в лімфатичних вузлах була більшою, ніж у хворих без метастазування. Підвищення кількості ПАМ у пухлині (> 23 %) прогнозує несприятливий перебіг захворювання та низькі показники виживання пацієнтів.

Бібліографічні посилання

1. **Бережная Н. М.** Иммунология злокачественного роста / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун. – К. : Наукова думка, 2005. – 791 с.
2. **Бережная Н. М.** Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. – Ч. 1. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология. Научно-практический журнал. – 2009. – № 1. – С. 6–17.
3. **Бубновська Л. М.** Рівень гіпоксії у тканині раку шлунка та перебіг захворювання / Л. М. Бубновська, С. П. Осинський // Онкология. Научно-практический журнал. – 2009. – № 1. – С. 39–44.

4. **Васильев Ю. М.** Опухолевые клетки и их окружение // Методологические аспекты изучения онкогенеза. – 1988. – № 6. – С. 85–95.
5. **Велика** медична енциклопедія / Упоряд. Б. В. Петровський та ін. – М. : Радянська енциклопедія, 1977. – 712 с.
6. **Войтенков В. О.** Основные характеристики макрофага как клетки эффектора: Обзор / В. О. Войтенков, В. В. Окулов // Вестн. Рос. АМН. – 1995. – № 4. – С. 59–64.
7. **Володько Н. А.** Метастазування злоякісних пухлин: роль факторів пухлинного мікрооточення. – Львів : Медицина світу, 2002. – 200 с.
8. **Молекулярная** диагностика опухолей / С. П. Осинский, Д. Ф. Глузман, Й. Клифф и др. – К. : ДІА, 2007. – 248 с.
9. **Осинский С. П.** Микрофизиология опухолей / С. П. Осинский, П. Ваупель. – К. : Наукова думка, 2009. – 256 с.
10. **Соколова І. Є.** Основи імунології / І. Є. Соколова, А. І. Вінніков, Т. М. Полішко. – Д. : Вид-во Дніпропетр. ун-ту, 2007. – 265 с.
11. **Щепотін І. Б.** Онкологія / І. Б. Щепотін, В. Л. Ганул, І. О. Кліменко. – К. : Книга плюс, 2006. – 496 с.
12. **Янкин А. В.** Современная хирургия рака желудка // Лаб. справа. – 1990. – № 7. – С. 29–31.
13. **Bingle L.** The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: Implications for new anticancer therapies [in PubMed Central will retrieve] / N. J. Brown, C. K. Lewis // J. Pathol. – 2002. – N 196 (3). – P. 254–265.
14. **Lewis C. E.** Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments / C. E. Lewis, J. W. Pollard // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66. – P. 605–612.

Надійшла до редколегії 04.03.2012