

Д.С. Осинський<sup>1</sup>, А.В. Ковельська<sup>2</sup>, Л.М. Бубновська<sup>2</sup>,  
І.І. Ганусевич<sup>2</sup>, Л.Д. Гуменюк<sup>2</sup>, С.П. Осинський<sup>2</sup>, С.П. Меренцев<sup>1</sup>, Л.А. Мамонтова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський міський клінічний онкологічний центр

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

## Зв'язок CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, з гіпоксичним профілем раку шлунка, дисемінованими пухлинними клітинами та перебігом захворювання

У 80 та 85,7% хворих пухлини виявились CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> відповідно. Медіана кількості CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин становила 34,4 та 36,4% відповідно. За наявності дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) у кістковому мозку кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин у пухлині була малою (нижче медіани). Вірогідність появи ДПК підвищувалася у 2,9 та 3,2 рази, коли у пухлинах була мала кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин відповідно. Вірогідність наявності малої кількості CD8<sup>+</sup> Т-клітин у пухлині зростала у 5 разів, коли сильна та середня гіпоксія була виявлена у пухлині. Загальна виживаність краща у хворих із пухлинами, в яких відзначали велику кількість (вище медіани) CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин. Прогностичне значення інфільтрації пухлини CD8<sup>+</sup> Т-клітинами було знайдено лише для хворих із категорією M<sub>0</sub>. Велика кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин у тканині раку шлунка асоціюється з низькою частотою появи ДПК та кращими показниками виживаності хворих.

**Ключові слова:** рак шлунка; лімфоцити, що інфільтрують пухлину; гіпоксія пухлини; дисеміновані пухлинні клітини; виживаність.

### Вступ

Рак шлунка є одним із найбільш поширених новоутворень в Європі, посідаючи 5-те місце після раку легень, передміхурової залози, товстого кишечника і сечового міхура у чоловіків та раку молочної залози, товстого кишечника, легень й тіла матки у жінок (Catalano M. et al., 2009). В Україні у 2012 р. річний показник захворюваності на рак шлунка становив 24,4 на 100 тис. населення та посів 4-те місце після раку легень, шкіри і передміхурової залози у чоловіків та 7-ме місце після раку молочної залози, шкіри, тіла матки, товстого кишечника, прямої кишки і шийки матки у жінок (Федоренко З.П. та співавт., 2014). Результати лікування хворих на рак шлунка все ще незадовільні, що у більшості випадків спричиняється віддаленими метастазами. Приховані метастази розглядаються як особлива проблема, тому що вони не виявляються традиційними методами, хоча можуть існувати ще до первинної операції і можуть бути виявлені молекулярними методами у периферичній крові й кістковому мозку хворих із категорією M<sub>0</sub> (Kienle P., Koch M., 2001; Kang Y., Pantel K., 2013). Пухлинні клітини у кістковому мозку, або дисеміновані пухлинні клітини (ДПК), розглядаються як важлива клінічна проблема, тому що ДПК здатні знаходитись у кістковому мозку тривалий час та призводити до появи віддалених метастазів через багато років після успішного лікування (Demicheli R. et al., 2007; Uhr J.W., Pantel K., 2011).

Незважаючи на те що ДПК активно досліджуються, зусилля щодо пошуку асоціації між появою ДПК у кістковому мозку та характеристиками первинної пухлини, зокрема

пухлинного мікрооточення, яке відіграє ключову роль у рості пухлини, явно недостатні. Особливе місце у пухлинному мікрооточенні посідає внутрішньопухлинна гіпоксія, яка, як добре відомо, є домінуючим фактором у формуванні агресивності пухлини та зляканої прогресії (Vaupel P. et al., 2004). У контексті наведеного, слід відзначити наші дослідження, в яких було показано, що ДПК у кістковому мозку виявляють у 51,4% хворих на рак шлунка з категорією M<sub>0</sub>, при цьому у 75% хворих пухлини характеризувалися сильною та середньою гіпоксією (Bubnovskaia L. et al., 2014).

Водночас слід зауважити, що стромальний компонент пухлинного мікрооточення також відіграє важливу роль у пухлинному рості (Mueller M.M., Fusenig N.E., 2004; Hanahan D., Weinberg R.A., 2011; Hanahan D., Coussens L.M., 2012; Semenza G.L., 2013; Casazza A. et al., 2014). Виконується багато досліджень щодо встановлення ролі лімфоцитів, інфільтруючих пухлину (ЛІП), у пухлинній прогресії та їх впливу на перебіг захворювання. Особлива увага концентрується на CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитах як головних протипухлинних компонентах адаптивного імунітету. Показано, що наявність великої кількості лімфоцитів, особливо Т-клітин, є індикатором сприятливого прогнозу при багатьох пухлинах (Pagès F. et al., 2010). Різні дослідження продемонстрували, що велика кількість імунних клітин, зокрема CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитів, асоціюється з позитивними показниками загальної виживаності хворих на рак молочної залози (Mahmoud S.M.A. et al., 2011; Liu S. et al., 2012), рак підшлункової залози (Iino Y. et al., 2013),

аденокарциному стравоходу (Enomoto K. et al., 2012), пухлини голови та шиї (Balerm-pas P. et al., 2014), карциному сечових шляхів (Sharma P. et al., 2007), колоректальний рак (Pagès F. et al., 2009; Ling A. et al., 2014). Проте було показано, що інфільтрація пухлинної тканини CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитами корелювала з поганими показниками хворих на рак нирки (Hotta K. et al., 2011).

Кількість публікацій щодо зв'язку між Т-лімфоцитами та раком шлунка обмежена (Ishigami S. et al., 2000; Fukuda K. et al., 2002; Lee H.E. et al., 2008; Wakatsuki K. et al., 2013). Так, наведено дані, що хворі з високим рівнем інфільтрації пухлини природними клітинами-кілерами (CD57<sup>+</sup> клітини) мали кращий прогноз (Ishigami S. et al., 2000), але K. Fukuda та співавтори (2002) не виявили суттєвої різниці між показниками виживаності хворих зі значною та малою кількістю ЛІП, зокрема CD4 та CD8 Т-лімфоцитів і зрілих активованих Т-клітин. Водночас було показано, що хворі з низьким рівнем апоптозу ЛІП жили значно довше, ніж ті, що мали високий рівень апоптозу у ЛІП. S. Ohno та співавтори (2002) продемонстрували, що підвищена кількість CD8<sup>+</sup> Т-клітин у тканині раку шлунка продукувала перевагу у виживаності завдяки індукції апоптозу пухлинних клітин. Автори також показали, що наявність CD8 Т-клітин зворотно корелювала з кількістю стромального колагену, та припустили, що підвищений рівень колагену стромі пухлини є перешкодою для інфільтрації пухлини CD8<sup>+</sup> Т-клітинами і може бути одним із механізмів виходу пухлини з-під імунної атаки організму. H.E. Lee та співавтори (2008) продемонстрували, що хворі з великою щільністю накопи-

**Таблиця 1** **Характеристики хворих на рак шлунка (n=91)**

Показник	Кількість, n (%)
<b>Стать</b>	
- чоловіки	60 (65,9)
- жінки	31 (34,1)
<b>Вік, років</b>	
- медіана	61,0
- розкид	26–84
<b>Анатомічна локалізація пухлини</b>	
- верхня третина	9 (9,9)
- середня третина	20 (22,0)
- нижня третина	55 (60,4)
- тотальне ураження	7 (7,7)
<b>Стадії UICC</b>	
I	22 (24,2)
II	20 (22,0)
III	27 (29,6)
IV	22 (24,2)
<b>Гістологічний тип</b>	
- аденокарцинома	60 (65,9)
- слизова аденокарцинома	12 (13,2)
- персневидно-клітинна карцинома	15 (16,5)
- недиференційована карцинома	4 (4,4)
<b>Ступінь диференціації (G)</b>	
1	5 (5,5)
2	17 (18,7)
3	62 (68,1)
4	7 (7,7)
<b>T-категорія</b>	
T <sub>1</sub>	10 (11,0)
T <sub>2</sub>	19 (20,9)
T <sub>3</sub>	37 (40,6)
T <sub>4</sub>	25 (27,5)
<b>N-категорія</b>	
N <sub>0</sub>	50 (54,9)
N <sub>1-2</sub>	41 (45,1)
<b>Віддалені метастази</b>	
M <sub>0</sub>	79 (86,8)
M <sub>1</sub>	12 (13,2)

чення CD3, CD8 та CD45RO T-клітин у пухлинні мали значно довшу тривалість життя, ніж хворі з низькою щільністю цих клітин. Нещодавнє дослідження показало, що високу щільність інфільтрації CD8<sup>+</sup> T-лімфоцитами пухлини виявлено у 53,8% хворих на рак шлунка, а низька щільність CD8<sup>+</sup> T-лімфоцитів у первинній пухлині асоціюється з несприятливим прогнозом порівняно з їх високою щільністю (Tupcel T. et al., 2013). K. Wakatsuki та співавтори (2013) повідомили, що загальна та без ознак захворювання виживаність хворих на рак (який характеризувався значною кількістю CD45RO<sup>+</sup> T-клітин) була вища, ніж у хворих з малою кількістю цих клітин. Автори також визначили більш значну локальну експресію інтерферону-γ у пухлинах із високим рівнем CD45RO<sup>+</sup> клітин, ніж у пухлинах з їх низьким рівнем.

Наведені дані дозволяють дійти висновку, що у хворих із високим рівнем CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> T-лімфоцитів у більшості пухлин має місце краща виживаність, ніж у хворих із низьким рівнем цих лімфоцитів у пухлинах. Водночас Z. Mei та співавтори занотували, що прогностичне значення ЛІП у раку шлунка залишається спірним у зв'язку з лімітованою кількістю досліджень (Mei Z. et al., 2014).

Як зазначено раніше, гіпоксія активно впливає на ріст і зложісну прогресію пухлини та розглядається як фактор несприятливого прогнозу (Vaupel P., Mayer A., 2007; Semenza G.L., 2013). При цьому залишається

обмеженою кількість даних щодо можливого зв'язку між гіпоксією пухлини та кількістю ЛІП, зокрема при раку шлунка. Крім того, вплив ЛІП на дисемінацію пухлинних клітин, зокрема у кістковий мозок, досі не встановлений.

Мета нашого дослідження полягала у виявленні зв'язку між ДПК і ЛІП, зокрема CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> T-лімфоцитами як компонентами пухлинного мікрооточення, між ЛІП і рівнем гіпоксії у пухлинній тканині та асоціації між ЛІП і перебігом пухлинного процесу у хворих на рак шлунка.

### Об'єкт і методи дослідження

До дослідження залучено 91 хворого (60 чоловіків та 31 жінка) на первинний рак шлунка, які проходили лікування в Київському міському клінічному онкологічному центрі у 2009–2012 рр. (табл. 1). Пацієнти не отримували передопераційної терапії, у більшості з них був розповсюджений процес, і вони отримували післяопераційну хіміотерапію. Зразки пухлини для всіх досліджень отримували відразу після видалення пухлини. Стадію захворювання визначали відповідно до номенклатури UICC (Sobin L.H., Wittekind C. (Eds), 2002) та гістологічну класифікацію пухлини — згідно з рекомендаціями ВООЗ (Fenoglio-Preiser C. et al., 2000). Усі хворі були поінформовані про дослідження та дали свою письмову згоду на використання операційного матеріалу.

### Імуногістохімічне дослідження пухлинної тканини

Експресію CD8 та CD45RO визначали на депарарфінованих зрізах пухлинної тканини імуногістохімічними фарбуваннями за допомогою специфічних моноклональних антитіл: клону C8/144B («Dako Cytomation», Данія) та клону UCHL1 («Sigma», США) відповідно. Імунна реакція була зафіксована та візуалізована полімер-пероксидазним методом (EnVision+ /HRP та 3,3'-diaminobenzidine; «Dako Cytomation») з наступним дофарбуванням гематоксиліном Майєра. У негативному контролі первинної антитіла були заміщені розчином фосфатного буферу (phosphate buffered saline — PBS). Внутрішньопухлинні CD<sup>+</sup> клітини підраховували на 1 тис. клітин у кожному зрізі та визначали їх частку у відсотках. При визначенні у пухлині >1% імунореактивних клітин випадок оцінювали як позитивний.

### Виявлення пухлинних клітин у кістковому мозку

2,0–3,0 мл аспірату кісткового мозку отримували перед операцією за допомогою стерильної пункції, з подальшою обробкою відповідно до протоколу виявлення ДПК у кістковому мозку. Пухлинні клітини у цитоспінових препаратах кісткового мозку визначали імуноцитохімічним методом за допомогою антитіл до панцитокератинів (клон AE1/AE3, «Dako Cytomation»). Кожен аналіз мав негативний контроль: фарбування цитоспіну неспецифічним IgG1 (клон MOPC21, «Sigma»). Кількість цитокератинопозитивних (ЦК<sup>+</sup>) клітин, іншими словами ДПК, рахували на 10<sup>6</sup> мононуклеарів кісткового мозку. Зраз-

ки визначали як позитивні, якщо ≥1 ЦК<sup>+</sup> клітин реєстрували на 10<sup>6</sup> мононуклеарів кісткового мозку (досліджували 6–12 цитоспінів від кожного зразка кісткового мозку).

### Аналіз активності матриксної металопротеїнази (ММП)-2 та -9

Зразки пухлини після отримання були занурені у рідкий азот для подальшої обробки. Активність ММП-2 та -9 визначали методом зимографії у 12% поліакриламідному гелі з SDS та 0,1% розчином желатину у ролі субстрату (Osinsky S. et al., 2011).

### <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопія

Рівень пухлинної гіпоксії оцінювали методом <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопії у перхлорних екстрактах тканини за допомогою спектрометра Bruker 400 МГц (Widebore Ultrashield, AV-400 electronics, Німеччина). Усі деталі методу наведено в наших попередніх публікаціях (Бубновська Л.М. та співавт., 2010; Osinsky S.P. et al., 2011).

### Статистичний аналіз

Статистичний аналіз виконано за допомогою пакетів прикладних програм «NCSS 2000/PASS 2000» та «Prism» версії 4.3. Різницю між показниками оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента, кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r), прогностичне значення показників оцінювали за допомогою пропорційної моделі Сох з використанням χ<sup>2</sup>-тесту, коефіцієнта ризику (Hazard ratio — HR) та коефіцієнта вірогідності (Odds ratio — OR). Виживаність 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

#### CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітини у пухлинній тканині та їх кореляції з клінічними характеристиками пацієнтів

Індивідуальні дані пацієнтів наведені у табл. 1. Загалом, у 80 і 85,7% пацієнтів були пухлини з CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> T-лімфоцитами відповідно. Середня кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин у пухлині становила 37,3±2,5 та 40,8±2,7% відповідно. Медіана кількості CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин становила 34,4 (розкид — 5,0–78,8) та 36,4% (розкид — 5,0–92,3) відповідно.

Використовуючи значення медіани, всі CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> пухлини були розподілені на групи з малою або великою кількістю клітин: коли кількість CD8<sup>+</sup> і CD45RO<sup>+</sup> клітин була менша або більша за значення медіани їх кількості відповідно. Не було виявлено взаємозв'язку між наявністю в пухлині T-лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, і клініко-патологічними характеристиками хворих (табл. 2 і 3). Водночас спостерігалася менша кількість пацієнтів із пухлинами, які характеризувалися як низькою, так і високою інфільтрацією у випадках слизової аденокарциноми, персневидно-клітинної карциноми та за наявно-

Таблиця 2 CD8<sup>+</sup> Т-клітини у тканині раку шлунка та клінічні характеристики хворих

Показник	Хворі з CD8 <sup>+</sup> Т-клітинами у пухлині	
	Мала кількість (<медіани) (n=36; 52,9%)	Велика кількість (>медіани) (n=32; 47,1%)
<b>Стать</b>		
- чоловіки (n=47)	25 (36,8)	22 (32,3)
- жінки (n=21)	11 (16,2)	10 (14,7)
<b>Вік, років (медіана, розкид)</b>	57,5 (26–77)	64 (29–81)
<b>Гістологічний тип</b>		
- аденокарцинома	23 (33,9)	24 (35,3)
- слизова аденокарцинома	3 (4,4)	3 (4,4)
- персневидно-клітинна карцинома	9 (13,2)	5 (7,3)
- недиференційована карцинома	1 (1,5)	0
<b>Анатомічна локалізація</b>		
- верхня третина	2 (2,9)	4 (5,9)
- середня	8 (11,7)	7 (10,3)
- нижня	25 (36,8)	18 (26,5)
- тотальне ураження	1 (1,5)	3 (4,4)
<b>Ступінь диференціювання (G)</b>		
1	3 (4,4)	1 (1,5)
2	5 (7,3)	6 (8,8)
3	24 (35,3)	24 (35,3)
4	4 (5,9)	1 (1,5)
<b>Стадії UICC</b>		
I	10 (14,7)	8 (11,8)
II	9 (13,2)	7 (10,3)
III	9 (13,2)	10 (14,7)
IV	8 (11,8)	7 (10,3)
<b>T-категорія</b>		
1	6 (8,8)	3 (4,4)
2	7 (10,3)	8 (11,8)
3	16 (23,5)	12 (17,6)
4	7 (10,3)	9 (13,2)
<b>N-категорія</b>		
N <sub>0</sub>	22 (32,4)	16 (23,5)
N <sub>1-2</sub>	14 (20,6)	16 (23,5)
<b>Віддалені метастази</b>		
M <sub>0</sub>	31 (45,6)	28 (41,2)
M <sub>1</sub>	5 (7,3)	4 (5,9)

ті віддалених метастазів (категорія M<sub>1</sub>). Більше того, помічена менша кількість хворих із високим рівнем CD45RO<sup>+</sup> клітин та категорією N<sub>1-2</sub>, але взаємозв'язок був статистично не достовірним.

### ЛІП та ДПК у кістковому мозку

При виявленні ДПК у кістковому мозку пацієнтів кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин у пухлині становила 23,6 та 17,0%, за відсутності ДПК — 72,4 та 41,8% відповідно (p<0,05). Визначено, що вірогідність появи ДПК у кістковому мозку хворих підвищувалася майже у 3 рази (OR=2,9; 95% CI 1,13–7,42;  $\chi^2=5,06$ ; p<0,05) та у >3 рази (OR=3,2; 95% CI 1,10–9,29;  $\chi^2=4,15$ ; p<0,05), коли у пухлинах виявляли малу кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин відповідно.

### ЛІП та їх кореляція з рівнем гіпоксії у первинній пухлині

Виявлено взаємозв'язок між кількістю ЛІП і рівнем гіпоксії в первинній пухлині, який оцінювали за допомогою ЯМР-спектроскопії. Отримані дані чітко демонструють, що кількість ЛІП знижується у приблизно 2 рази в умовах сильної та середньої гіпоксії в пухлинній тканині (табл. 4). Більше того, показано, що вірогідність наявності незначної кількості CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів у пухлині підвищується в 5 разів (OR=4,926; 95% CI 1,7027–23,628; p=0,046), коли пухлини характеризуються сильною та середньою гіпоксією. Водночас взаємозв'язку між кількістю CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин з рівнем гіпоксії в пухлині не виявлено.

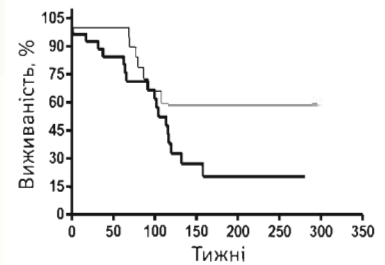
### Загальна виживаність хворих із малою та великою кількістю CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитів

Показники загальної виживаності були значно кращі у хворих, пухлини яких характеризувалися великою кількістю CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин порівняно з пацієнтами, в пухлинах яких налічувалася мала кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин (log rank test: p=0,042 і p=0,004 відповідно, рис. 1 та 2).

Впродовж терміну спостереження 24 із 91 обстежуваних пацієнтів померли (смерть пов'язана з основним захворюванням) при медіані тривалості життя, що становить 19,9 міс після операції (розкид — 1,6–36,4). 5-річна загальна виживаність хворих після операції становила 62,5% для всіх обстежених пацієнтів. Відзначимо, що всі пацієнти, в яких спостерігали 5-річну виживаність, отримували ад'ювантну хіміотерапію. Внутрішньопухлинну велику кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин спостерігали у 75 та 100% випадків у цих хворих відповідно.

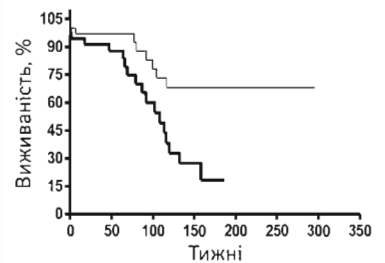
Медіана терміну спостереження для всіх пацієнтів становила 21,1 міс (розкид — 0,3–68,2) з моменту встановлення діагнозу. Загалом 27 (29,7%) померли упродовж терміну спостереження. У 24 (88,9%) обстежуваних пацієнтів смерть була спричинена основним захворюванням при медіані тривалості життя 19,9 міс після операції (розкид — 1,6–36,4). З них у 19 (79,2%) пацієнтів визначали CD8<sup>+</sup>, а у 21 (87,5%) — CD45RO<sup>+</sup> Т-клітини у пухлині. Серед пацієн-

Рис. 1



Криві загальної виживаності хворих на рак шлунка згідно з Kaplan — Meier як функція кількості CD8<sup>+</sup> Т-клітин у пухлині (велика кількість CD8<sup>+</sup> Т-клітин вище медіани), тонка лінія; мала кількість CD8<sup>+</sup> Т-клітин нижче медіани), жирна лінія; p=0,042). Проаналізовані всі хворі

Рис. 2



Криві загальної виживаності хворих на рак шлунка згідно з Kaplan — Meier як функція кількості CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин у пухлині (велика кількість CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин вище медіани), тонка лінія; мала кількість CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин у пухлині (кількість CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин нижче медіани), жирна лінія; p=0,004). Проаналізовані всі хворі

тів, пухлини яких були позитивними щодо CD8 та CD45RO Т-лімфоцитів, 63,2 та 71,5% пацієнтів, які померли, мали пухлини з кількістю CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> клітин, меншою за медіану, а у 36,8 та 28,5% — більшою за медіану відповідно.

Взаємозв'язок між кількістю ЛІП та виживаністю пацієнтів залежно від методу їх лікування проаналізовано окремо: 31 (34,1%) пацієнт отримував лише хірургічне лікування, а 60 (65,9%) — ад'ювантну хіміотерапію.

Виживаність у групі пацієнтів «лише хірургічне лікування» характеризувалася такими показниками: 41,7% пацієнтів померли, коли кількість CD8<sup>+</sup> клітин у пухлині була нижча, а у 12,5% — вища за медіану; 41,7% пацієнтів померли, коли кількість CD45RO<sup>+</sup> клітин була нижча, а у 22,2% — вища за медіану. Слід зазначити, що 50% пацієнтів померли із CD8<sup>+</sup> та 67,9% пацієнтів — із CD45RO<sup>+</sup> пухлинами.

Аналіз виживаності в групі пацієнтів «операція + хіміотерапія» показав наступне: 56,2% пацієнтів померли, коли кількість CD8<sup>+</sup> клітин була нижча, а 45,4% — вища за медіану; 61,1% пацієнтів померли, коли кількість CD45RO<sup>+</sup> клітин була нижча і 28,6% — коли кількість CD45RO<sup>+</sup> клітин була вища за медіану. При цьому 40% пацієнтів із CD8<sup>+</sup> та 40% пацієнтів з CD45RO<sup>+</sup> пухлинами померли в цій групі.

Таблиця 3 CD45RO<sup>+</sup> Т-клітини у тканині раку шлунка та клінічні характеристики хворих

Показник	Хворі з CD8 <sup>+</sup> Т-клітинами у пухлині	
	Мала кількість (<медіани) (n=41; 52,6%)	Велика кількість (>медіани) (n=37; 47,4%)
<b>Стать</b>		
- чоловіки (n=47)	26 (33,4)	25 (32,0)
- жінки (n=21)	15 (19,2)	12 (15,4)
<b>Вік, років (медіана, розкид)</b>	62,5 (26–81)	62 (29–79)
<b>Гістологічний тип</b>		
- аденокарцинома	28 (35,9)	25 (32,0)
- слизова аденокарцинома	6 (7,7)	4 (5,1)
- персневидно-клітинна карцинома	5 (6,4)	7 (9,0)
- недиференційована карцинома	2 (2,6)	1 (1,3)
<b>Анатомічна локалізація</b>		
- верхня третина	2 (2,6)	6 (7,7)
- середня	9 (1,5)	7 (9,0)
- нижня	28 (35,9)	20 (25,6)
- тотальне ураження	2 (2,6)	4 (5,1)
<b>Ступінь диференціювання (G)</b>		
1	3 (3,8)	2 (2,6)
2	9 (11,5)	6 (7,7)
3	26 (33,4)	26 (33,4)
4	3 (3,8)	3 (3,8)
<b>Стадії UICC</b>		
I	7 (9,0)	13 (16,8)
II	9 (11,5)	8 (10,2)
III	17 (21,8)	7 (9,0)
IV	8 (10,2)	9 (11,5)
<b>Т-категорія</b>		
1	4 (5,1)	5 (6,4)
2	7 (9,0)	11 (14,1)
3	20 (25,7)	11 (14,1)
4	10 (12,8)	10 (12,8)
<b>N-категорія</b>		
N <sub>0</sub>	21 (26,9)	24 (30,8)
N <sub>1-2</sub>	20 (25,6)	13 (16,7)
<b>Віддалені метастази</b>		
M <sub>0</sub>	37 (47,4)	31 (39,7)
M <sub>1</sub>	4 (5,2)	6 (7,7)

Таблиця 4 Рівень гіпоксії CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітини у тканині раку шлунка

Рівень гіпоксії пухлини відповідно до співвідношення RME/PI	Кількість хворих із ЛІП, %		Кількість хворих без ЛІП, %	
	CD8 <sup>+</sup> клітини	CD45RO <sup>+</sup> клітини	CD8 <sup>+</sup> клітини	CD45RO <sup>+</sup> клітини
<1,4 (сильна/середня)	20,1±4,7	26,5±5,9	44,0	23,5
>1,4 (помірна/слабка)	38,9±5,6	32,1±5,3	18,0	28,0
	p<0,05		p<0,05	

Виявлено, що CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> позитивний статус не є незалежним прогностичним фактором загальної виживаності для всіх пацієнтів (p>0,05). Водночас встановлено, що у пацієнтів із категорією M<sub>0</sub>, які отримували ад'ювантну хіміотерапію та мали пухлини з кількістю CD8<sup>+</sup> клітин менше за медіану, ризик несприятливого перебігу захворювання зростає в 2,5 рази (HR=2,53; 95% CI 1,092–15,586;  $\chi^2=3,99$ ; p<0,049), а з кількістю CD45RO<sup>+</sup> клітин менше за медіану ризик несприятливого перебігу захворювання зростає у 3 рази (HR=2,99; 95% CI 1,098–19,220;  $\chi^2=4,76$ ; p<0,036).

Отримані дані дозволяють вважати клінічно значущою кількістю CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитів у ролі прогностичних факторів для пацієнтів із категорією M<sub>0</sub>, а саме без віддалених метастазів, що, можливо, більш важливо, ніж для пацієнтів із категорією M<sub>1</sub>.

Таким чином, CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітини у тканині раку шлунка виявлені у 80 та 85,7% пацієнтів відповідно. Отримані нами дані стосовно 20% пацієнтів, пухлини яких були негативні щодо CD8, зіставні з даними іншого дослідження (Mahmoud S.M.A. et al., 2011), згідно з яким відсутність CD8<sup>+</sup> Т-клітин у тканинах раку молочної залози відзначалась

у 19,75% пацієнтів. У нашому дослідженні, як і в інших, не було виявлено асоціації між ЛІП та клінічними характеристиками, хоча важливо звернути увагу на зменшення числа пацієнтів як з малою, так і з великою кількістю ЛІП у слизовій карциномі та персневидно-клітинному раку, а також за наявності віддалених метастазів (категорія M<sub>1</sub>).

Підкреслимо важливість виявленої кореляції між кількістю лімфоцитів та рівнем гіпоксії у пухлині: за більшого рівня гіпоксії спостерігається менша кількість лімфоцитів у пухлині. Це свідчить про вплив гіпоксії щодо формування агресивності пухлини, оскільки відомо, що велика кількість лімфоцитів є фактором сприятливого прогнозу майже для всіх видів пухлин. Зв'язок між рівнем ЛІП у тканині раку шлунка та виживаністю пацієнтів був встановлений і в нашому дослідженні: велика кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитів була асоційована із кращими показниками загальної виживаності пацієнтів. Також результати нашого дослідження співпали як із вже відомими (Lee H.E. et al., 2008), так і з нещодавно отриманими результатами інших досліджень (Tupcel T. et al., 2013; Wakatsuki K. et al., 2013) стосовно позитивного впливу високої щільності ЛІП у раку

шлунка на виживаність хворих. Водночас не виявлено кореляції між CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитами у пухлині та загальною виживаністю хворих на рак шлунка, хоча наявність високого співвідношення Foxp3<sup>+</sup>Tregs/CD8<sup>+</sup> асоціювалася із незадовільною виживаністю (Shen Z. et al., 2010).

Різноманітні механізми, які пропонуються для пояснення функції лімфоцитів у пухлині, зокрема їх протипухлинного ефекту, розглядаються у багатьох публікаціях. Заслугує на увагу інформація щодо значно вищого рівня інтерферону- $\gamma$  у пухлинах шлунка, які характеризуються високою щільністю CD45RO<sup>+</sup> клітин, порівняно із таким у пухлинах із малою щільністю цих клітин (Wakatsuki K. et al., 2013). Автори припустили, що CD45RO<sup>+</sup> Т-клітини здатні індукувати локальну імунну реакцію.

Слід також відзначити зворотну кореляцію між кількістю ЛІП та наявністю ДПК у кістковому мозку: відсутність ДПК супроводжувалася великою кількістю ЛІП, зокрема 72,4% CD8<sup>+</sup> та 41,8% CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин (p<0,05). Ці дані дозволяють розглядати ЛІП як стримувальний фактор («keeping factor»), який запобігає виходу пухлинних клітин із первинного вузла, дисемінації у кровообіг та потраплянню у віддалені органи, зокрема у кістковий мозок.

Важливим є наше спостереження щодо асоціації між кількістю ЛІП та активністю ММП у пухлині. За результатами раніше проведеного дослідження встановлено, що кількість ЛІП (CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітини) у тканині раку шлунка корелювала з наявністю метастазів у лімфатичних вузлах, але не з глибиною пухлинної інвазії (Lee H.E. et al., 2008). Автори припустили, що прогностична роль ЛІП в основному зосереджена на зменшенні метастатичного потенціалу. У проведеному нами дослідженні встановлено, що активність ММП-2 у тканині раку шлунка зворотно корелює з кількістю CD8<sup>+</sup> (r=-0,3; p=0,039) та CD45RO<sup>+</sup> (r=-0,33; p=0,031) Т-клітин у пухлині. Водночас кореляція між активністю ММП-9 та Т-клітинами у пухлині не встановлена. Крім того, нами визначено, що кількість хворих із категорією N<sub>1-2</sub> була меншою за умови великої кількості CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин, хоча цей зв'язок при статистичному аналізі виявився лише тенденцією. Отримані результати та їх обговорення дозволяють поставити питання щодо впливу ЛІП на метастазування, хоча б частково, через модуляцію активності ММП-2 у пухлині.

Беручи до уваги наші результати та багатьох інших досліджень, слід звернути увагу на правомірність пропозиції F. Pagès та співавторів (2010), які одну зі своїх статей назвали «Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored».

## Висновки

Дослідженням встановлено, що мала кількість CD8<sup>+</sup> Т-клітин у пухлині асоціюється із сильною та середньою гіпоксією у пухлинній тканині. Велика кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-клітин корелює з низькою частотою наявності ДПК у кістковому мозку.

Також було визначено, що велика кількість CD8<sup>+</sup> та CD45RO<sup>+</sup> Т-лімфоцитів асоціюється із кращими показниками виживаності

хворих на рак шлунка. Виявлено, що мала кількість CD8<sup>+</sup> Т-клітин є фактором несприятливого прогнозу у хворих із категорією M<sub>0</sub>.

## Подяка

Дослідження підтримано Національною академією наук України (проекти № 2.2.5.360 та № 2.2.5.365).

## Список використаної літератури

**Бубновська Л.М., Ковельська А.В., Болдескул І.Є. та ін.** (2010) Прогностичне значення метаболічних співвідношень у тканині раку шлунка людини, визначених ЯМР-спектроскопією перхлорних екстрактів. *Пром. діагностика, пром. терапія*, 1: 13–22.

**Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й., Гулак Л.О. та ін.** (2014) Рак в Україні, 2012–2013. Бюлетень Національного канцер-реєстру України, 15: 26–27.

**Balempas P., Michel Y., Wagenblast J. et al.** (2014) Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br. J. Cancer*, 110(2): 501–509.

**Bubnovskaya L., Kovelskaya A., Gumenyuk L. et al.** (2014) Disseminated tumor cells in bone marrow of gastric cancer patients: correlation with tumor hypoxia and clinical relevance. *J. Oncol.*, 1: 1–7.

**Casazza A., DiConza G., Wenes M. et al.** (2014) Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*, 33(14): 1743–1754.

**Catalano M., Labianca R., Beretta G.D. et al.** (2009) Gastric cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 71(2): 127–164.

**Demicheli R., Retsky M.W., Hrushesky W.M.J., Baum M.** (2007) Tumor dormancy and surgery-driven interruption of dormancy in breast cancer: learning from failures. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4(12): 699–719.

**Enomoto K., Sho M., Wakatsuki K. et al.** (2012) Prognostic importance of tumor-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.*, 168(2): 186–191.

**Fenoglio-Preiser C., Carneiro F., Correa P.** (2000) Gastric carcinoma, in *World Health Organization Classification of Tumors. Tumours of the Stomach*. S.R. Hamilton, L.A. Aaltonen (Eds.), 3(3): 39–52.

**Fukuda K., Tsujitani S., Maeta Y. et al.** (2002) The expression of RCAS1 and tumor infiltrating lymphocytes in patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer*, 5(4): 220–227.

**Hanahan D., Weinberg R.A.** (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646–674.

**Hanahan D., Coussens L.M.** (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3): 309–322.

**Hotta K., Sho M., Fujimoto K. et al.** (2011) Prognostic significance of CD45RO<sup>+</sup> memory T cells in renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 105(8): 1191–1196.

**Ino Y., Yamazaki-ito R., Shimada K. et al.** (2013) Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 108(4): 914–923.

**Sobin L.H., Wittekind C. (Eds)** (2002) International Union Against Cancer, TNM classification of malignant tumors. Wiley-Liss, New York, USA, 6<sup>th</sup> ed.

**Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K. et al.** (2000) Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*, 88(3): 577–583.

**Kang Y., Pantel K.** (2013) Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*, 23(5): 573–581.

**Kienle P., Koch M.** (2001) Minimal residual disease in gastrointestinal cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 20(4): 282–293.

**Lee H.E., Chae S.W., Lee Y.J. et al.** (2008) Prognostic implications of type and density of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 99(10): 1704–1711.

**Ling A., Edin S., Wikberg M.L. et al.** (2014) The intratumoral sub-site and relation of CD8<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> T

lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues. *Br. J. Cancer*, 110(1): 2551–2559.

**Liu S., Lachapelle J., Leung S. et al.** (2012) CD8<sup>+</sup> lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 14: R48.

**Mahmoud S.M.A., Paish E.C., Powe D.G. et al.** (2011) Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 29(15): 1949–1955.

**Mei Z., Liu Y., Liu C. et al.** (2014) Tumor-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer*, 110(6): 1595–1605.

**Mueller M.M., Fusenig N.E.** (2004) Friends or foes-bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 4(11): 839–849.

**Ohno S., Tachibana M., Fujii T. et al.** (2002) Role of stromal collagen in immunomodulation and prognosis of advanced gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, 97(6): 770–774.

**Osinsky S., Bubnovskaya L., Ganusevich I. et al.** (2011) Hypoxia, tumor associated macrophages, microvessel density, VEGF and matrix metalloproteinases in human gastric cancer: interaction and impact on survival. *Clin. Trans. Oncol.*, 13(2): 133–138.

**Pagès F., Kirilovsky A., Mecnik B. et al.** (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 27(35): 5944–5951.

**Pagès F., Galon J., Dieu-Nosjean M.-C. et al.** (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8): 1093–1102.

**Semenza G.L.** (2013) Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene*, 31(35): 4057–4063.

**Sharma P., Shen Y., Wen S. et al.** (2007) CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(10): 3967–3972.

**Shen Z., Zhou S., Wang Y. et al.** (2010) Higher intratumoral infiltrated Foxp3<sup>+</sup> Treg numbers and Foxp3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 136(10): 1585–1595.

**Tuncel T., Karagoz B., Haholu A. et al.** (2013) Immunoregulatory function of HLA-G in gastric cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prevent.*, 14(12): 7681–7684.

**Uhr J.W., Pantel K.** (2011) Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108(4): 12396–12400.

**Vaupel P., Mayer A., Höckel M.** (2004) Tumor hypoxia and malignant progression. *Meth. Enzymol.*, 381: 335–354.

**Vaupel P., Mayer A.** (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.*, 26(2): 225–239.

**Wakatsuki K., Sho M., Yamato I. et al.** (2013) Clinical impact of tumor-infiltrating CD45RO<sup>+</sup> memory T cells on human gastric cancer. *Oncol.*, 29(5): 1756–1762.

## Связь CD8<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, с гипоксическим профилем рака желудка, диссеминированными опухолевыми клетками и течением заболевания

**Д.С. Осинский, А.В. Ковельская, Л.Н. Бубновская, И.И. Ганусевич, Л.Д. Гуменюк, С.П. Осинский, С.П. Меренцев, Л.А. Мамонтова**

**Резюме.** Установлено, что у 80 и 85,7% больных опухоли оказались CD8<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> соответственно. Медиана количества CD8<sup>+</sup>

и CD45RO<sup>+</sup> клеток составила 34,4 и 36,4% соответственно. При наличии диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозгу количество CD8<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> клеток в опухоли было малое (ниже медианы). Вероятность появления ДОК повышалась в 2,9 и 3,2 раза, когда в опухоли было малое количество CD8<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток соответственно. Вероятность наличия малого количества CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухоли возрастала в 5 раз, когда сильная и средняя гипоксия была выявлена в опухоли. Общая выживаемость была лучше у больных с опухолями, в которых отмечали большое количество (выше медианы) CD8<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> клеток. Прогностическое значение инфильтрации опухоли CD8<sup>+</sup> Т-клетками было найдено только для больных с категорией M<sub>0</sub>. Большое количество CD8<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток в ткани рака желудка ассоциируется с низкой частотой появления ДОК и лучшими показателями выживаемости больных.

**Ключевые слова:** рак желудка; лимфоциты, инфильтрирующие опухоль; гипоксия опухоли; диссеминированные опухолевые клетки; выживаемость.

## Association of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> tumor-infiltrating T lymphocytes with gastric cancer hypoxic profile, disseminated tumor cells and disease outcome

**D.S. Osinsky, A.V. Kovelskaya, L.N. Bubnovskaya, I.I. Ganusevich, L.D. Gumenyuk, S.P. Osinsky, S.P. Merentsev, L.A. Mamontova**

**Summary.** It was found that 80 and 85.7% of patients had CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> tumors, respectively. Median number of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells was 34.4 and 36.4%, respectively. When DTCs were detected, the number of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells in tumor was low. The probability of appearance of DTCs is increased by a factor of 2.9 and 3.2, when tumors had low number of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> T-cells, respectively. The probability of the presence of low number of CD8<sup>+</sup> T-cells in tumor is increased by a factor of 5.0, when severe and moderate hypoxia was detected in tumors. Overall survival was longer in patients with tumors with high number of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells. Prognostic significance was found for CD8<sup>+</sup> infiltration in GC of patients with M<sub>0</sub> category only. High number of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> T-cells in GC is associated with low frequency of DTC presence, and better survival.

**Key words:** gastric cancer; tumor-infiltration lymphocytes; tumor hypoxia; disseminated tumor cells; survival.

### Адреса для листування:

Дмитро Сергійович Осинський  
03115, Київ, вул. Верховинна, 69  
Київський міський клінічний  
онкологічний центр  
E-mail: dosinsky@ukr.net

Одержано 20.01.2015