



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59969 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00
G01N 33/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ У ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА

1

(21) u201012904

(22) 01.11.2010

(24) 10.06.2011

(46) 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 р.

(72) ОСИНСЬКИЙ СЕРГІЙ ПЕТРОВИЧ, БУБНОВСЬКА ЛАРИСА МИКИТИВНА, ГАНУСЕВИЧ ІРИНА ІВАНІВНА, КОВЕЛЬСЬКА АНТОНІНА ВАСИЛІВНА, ГУМЕНЮК ЛІЛІЯ ДМИТРІВНА, МЕРЕНЦЕВ СЕРГІЙ ПАВЛОВИЧ, ОЛІЙНИЧЕНКО ГЕНАДІЙ ПЕТРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак шлунка, що включає визначення кількості дисемінованих пухлинних клітин в кістковому мозку, який **відрізняється** тим, що додатково

2

во в пухлинній тканині визначають співвідношення фосфомоноестери/неорганічний фосфат, рівні експресії білка CD34 та концентрації активних форм матриксних металопротеїназ-2 та -9, і при наявності дисемінованих пухлинних клітин в кістковому мозку, величині співвідношення фосфомоноестери/неорганічний фосфат, меншій ніж 1,4, експресії CD34, більшій ніж 142, і концентраціях активних форм матриксних металопротеїназ-2 та -9, вищих ніж, відповідно, 2,0 та 4,5мкг/г тканини, прогнозують несприятливий перебіг захворювання, а при відсутності дисемінованих пухлинних клітин в кістковому мозку, величині співвідношення фосфомоноестери/неорганічний фосфат, більшій ніж 1,4, експресії CD34, меншій ніж 142, і концентраціях активних форм матриксних металопротеїназ-2 та -9, нижчих ніж, відповідно, 2,0 та 4,5мкг/г тканини, - сприятливий.

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до онкології, і може використовуватись для контролю ефективності протипухлинної терапії та прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак шлунка.

Оцінка можливого перебігу онкологічного захворювання та своєчасна корекція схеми лікування покращують ефективність терапії та показники виживаності хворих.

Для раку шлунка (РШ) використовується низка прогностичних показників, серед яких найпоширенішими є показники системи TNM [1], а також кількість дисемінованих пухлинних клітин (ДПК) в кістковому мозку (КМ) хворих [2]. В експериментальних дослідженнях та на клінічному матеріалі показано зв'язок між кількістю ДПК в КМ та окремими гіпоксія-залежними показниками в пухлинній тканині [3,4], але не запропоновано спосіб прогнозу перебігу РШ, який, окрім кількості ДПК у КМ, враховував би рівні гіпоксії та експресії або активності гіпоксія-залежних білків в пухлині.

Гіпоксія пухлини є найбільш характерною ознакою злоякісного новоутворення, яка сприяє пухлинній прогресії [5]. Рівень гіпоксії в пухлині

визначається за допомогою імуногістохімічного аналізу експресії гіпоксія-залежних білків [6]. Існує показник, який узагальнює прояви хронічної та гострої гіпоксії у тканині і характеризує рівень фосфорвміщуючих речовин, які задіяні в енергетичному обміні тканини, а саме співвідношення фосфомоноестери/неорганічний фосфат (PME/Pi) [7]. Гіпоксія-залежними ферментами є також матриксні металопротеїнази-2 та -9 (ММП-2 та -9), або желатинази А і В, відповідно, що здійснюють деградацію позаклітинного матриксу в процесі метастазування пухлини [8]. Рівні активності (концентрації активних форм) ММП-2 та -9 визначають методом зимографії в поліакриламідному гелі (ПААГ) та пов'язують із загальною виживаністю і рівнем метастазування у хворих на РШ [9].

За прототип прийнято спосіб застосування показника кількості ДПК в КМ хворих на РШ, визначеного за допомогою імуноцитохімічного методу, як маркера прогнозу перебігу захворювання (Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in

(19) UA (11) 59969 (13) U

the bone marrow / M. Heiss, E. Simon, B. Beyer et al. // J. Clin. Oncol. - 2002. - Vol. 20. - P.2005-2016).

Позитивним у прототипі є те, що застосований метод проводиться з використанням моноклональних антитіл і характеризується високим рівнем селективності.

Недоліками прототипу є те, що як маркер прогнозу використовують лише кількість ДПК в КМ і не враховують рівні гіпоксії та експресії або активності гіпоксія-залежних білків в пухлинній тканині хворих, що дозволило б оцінити ступінь агресивності пухлини.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб прогнозування перебігу захворювання у хворих на рак шлунка шляхом визначення показника гіпоксії RME/PI. рівня експресії білка CD34 та концентрацій активних форм металопро-теїназ-2 та -9 в пухлинній тканині додатково до визначення кількості ДПК в КМ, що дасть можливість комплексної оцінки ступеня агресивності пухлини та дозволить контролювати ефективність протипухлинної терапії, корегувати схеми лікування та покращити показники виживаності.

Поставлена задача вирішувалася наступним чином:

За 1-2 доби до оперативного втручання в результаті стандартної процедури пункції КМ із стерильної кістки отримували пунктат КМ, з якого виділяли моноклеарні клітини та зберігали їх при температурі -20°C до часу використання. Моноклеарні клітини наносились на скельця в процесі центрифугування на цитоцентрифузі впродовж 10сек. при 1500об/хв. Виявлення наявності цитокератин-позитивних клітин серед моноклеарів КМ на цитоспінових препаратах здійснювали, використовуючи метод APAAP (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) та систему візуалізації EnVision™ G/2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red) ("Dako Cytomation", Данія). Як первинні антитіла використовували моноклональні мишачі антитіла проти цитокератину (клон AE1/AE3, "Dako Cytomation", Данія). Дофарбування ядер здійснювали 0,1% розчином метилового зеленого. За допомогою світлового мікроскопа візуалізували ДПК як забарвлені червоним клітини на зеленому тлі та проводили підрахунок.

Частина пухлинної тканини, отриманої у того ж хворого під час оперативного втручання, одразу занурювали в забуферений формалін, після чого готували парафінові блоки за стандартною методикою. Парафінові блоки за допомогою мікротома нарізали на зрізи товщиною 4-6мкм, які наносили на предметне скло. Іншу частину пухлинної тканини, отриманої під час операції, зберігали в рідкому азоті при температурі -180°C не більше, ніж 1 місяць.

Отриману під час операції тканину, що зберігалась в рідкому азоті, гомогенізували і розділяли на два зразки.

З метою визначення RME/PI методом ЯМР-спектроскопії [7] із зразка гомогенізованої пухлинної тканини екстрагували фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2 н HClO₄ (перхлорної кислоти) Потім рН перхлорного екстракту (ПХЕ) доводили до 7,6-8,0, дівалентні іони видаляли за допо-

могою Chelex 10мг/5мл (Sigma, США), фільтрували, ліофілізували та зберігали при температурі -20°C. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹P ЯМР-спектрометрі зразки розчиняли в 1,0мл D₂O, центрифугували і переносили в ЯМР-пробірки для аналізу.

Сpektри ПХЕ реєстрували на ЯМР-спектрометрі, використовуючи 5мм кювети. Сpektри вимірювали при 161,976 MHz, зі спектральною шириною в 64724,9 Hz, шириною імпульсу 90° та затримкою в 4сек. Тринатрієва сіль метилендифосфонієвої кислоти (Sigma) правила за стандарт. Всі ³¹P-хімічні зрушення у спектрах співвідносили до сигналу фосфокреатину (ФК), який позначався як 0,0ppm. Межа розподілу між гіпоксичними та добре окисенованими пухлинами складала 1,4 для всіх обстежених хворих. Пухлини, для яких співвідношення RME/PI < 1,4, вважались гіпоксичними, тоді як пухлини, для яких RME/PI > 1,4- добре окисенованими.

Концентрації активних та латентних форм ММП-2 та -9 в зразку гомогенізованої пухлинної тканини визначали методом зимографії в 12% ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1% желатину як субстрат [11]. 50мг пухлинної тканини гомогенізували в 1% розчині додецилсульфату натрію, гомогенат центрифугували при 3000об/хв., 20мкл надосаду вносили в лунки геля та проводили електрофорез при температурі +4°C, в напрузі електричного поля 150V, протягом 4 годин. Після розділення досліджуваних білків гель відмивали в 2,5% розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з додаванням хлориду кальцію (рН=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37°C, фіксували та забарвлювали 0,25% Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність ММП-2 та -9 візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їхня локалізація відповідала молекулярній масі кожного із ферментів, які визначалися за стандартами молекулярних мас.

Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису та визначали концентрації активних форм ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопро-теїназ. Межа розподілу між умовно високою та низькою концентраціями активних форм ферментів дорівнює 2,0мкг/г тканини для ММП-2 та 4,5мкг/г тканини для ММП-9, тобто, концентрації активних форм ММП-2 < 2,0мкг/г тканини та ММП-9 < 4,5мкг/г тканини вважались низькими, а концентрації активних форм ММП-2 > 2,0мкг/г тканини та ММП-9 > 4,5мкг/г тканини вважались високими.

Імуногістохімічне виявлення експресії білка CD34 проводили з використанням відповідних моноклональних антитіл CD34 (клас II, клон QBEnd, "Dako Cytomation", Данія) в розведенні 1:100 на депарафінізованих зрізах пухлинної тканини. Для виявлення експресії CD34 на зрізи наносили 1% розчин сироваточного альбуміну бика, потім проводили інкубацію препаратів з відповідними моноклональними антитілами в оптимальному розведенні протягом однієї години. Після промивання препаратів у розчині фосфатного буфера їх інкубували 40хв. у полімерному розчині. Для візуалі-

зації активності пероксидази використовували діамінобензидина тетрагідрохлорид (DAB) ("DakoCytomation", Данія) та дофарбовували зрізи гематоксиліном Майєра. За допомогою світлового мікроскопа візуалізували клітини, що експресують CD34, як клітини, забарвлені коричневим кольором. Використовуючи окулярну сітку 20×20 квадратів площею 1 см² перераховували кількість забарвлених клітин на 1 мм², і при значенні <142, пухлину вважали гіповаскуляризованою, а при значенні >142 - гіперваскуляризованою.

Встановлено, що у тих обстежених хворих, в КМ яких виявлені ДПК, а пухлинна тканина - гіпоксична, гіперваскуляризована, і в ній виявлено високі концентрації активних форм ММП-2 та -9, агресивність пухлини вважається високою, що є основою для прогнозування несприятливого перебігу захворювання.

У хворих, в КМ яких не виявлені ДПК, а пухлинна тканина - добре окисенована, гіповаскуляризована, і в ній виявлено низькі концентрації активних форм ММП-2 та -9, агресивність пухлини вважається низькою, що є основою для прогнозування сприятливого перебігу захворювання.

Критеріями ефективності використаного способу є покращання раннього виявлення рецидивів та/або метастазів пухлини, корекції схем лікування, що призводить до підвищення ефективності терапії та подовження життя хворих на РШ.

За розробленою методикою обстежено 56 хворих на РШ. У 38 хворих виявлено високу агресивність пухлини та встановлено негативний прогноз перебігу захворювання, у 18 - низьку агресивність пухлини та позитивний прогноз перебігу захворювання.

Прикладами реалізації заявленого способу можуть вважатися наведені витяги з Історій хвороби двох хворих.

І. Хвора Ш., 1943 року народження (Історія хвороби №17729. АК №14996/06. ПГЗ №46745-60/06 - низькодиференційована аденокарцинома шлунка, T₂N₀M₀, G4, стадія ІВ). Виконана операція - дистальна субтотальна резекція шлунка за Більрот-II у модифікації Гофмейстера-Фінстерера.

За 1-2 доби до оперативного втручання в результаті стандартної процедури пункції КМ із стерильної кістки хворої отримували пунктат КМ, з якого виділяли моноклеарні клітини та зберігали їх при температурі -20°C до часу використання. Моноклеарні клітини наносились на скельця в процесі центрифугування на цитоцентрифузі впродовж 10сек. при 1500об/хв. Виявлення наявності цитокератин-позитивних клітин серед моноклеарів КМ на цитоспінових препаратах здійснювали, використовуючи метод APAAP та систему візуалізації EnVisionTM G/2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red) ("Dako Cytomation", Данія). В якості первинних антитіл використовували моноклональні мишачі антитіла проти цитокератину (клон AE1/AE3, "DakoCytomation", Данія). Дофарбування ядер здійснювали 0,1% розчином метилового зеленого. За допомогою світлового мікроскопа в КМ хворої були виявлені ДПК як забарвлені червоним клітини на зеленому тлі.

Частину пухлинної тканини, отриманої у тієї ж пацієнтки підчас оперативного втручання, одразу занурювали в забуферений формалін, після чого готували парафінові блоки за стандартною методикою. Парафінові блоки за допомогою мікротома нарізали на зрізи товщиною 4-6мкм, які наносили на предметне скло. Іншу частину пухлинної тканини, отриманої підчас операції, зберігали в рідкому азоті при температурі -180°C не більше, ніж 1 місяць.

Отриману під час операції тканину, що зберігалась в рідкому азоті, гомогенізували і розділяли на два зразки.

З метою визначення PME/Pi методом ЯМР-спектроскопії [7] із зразка гомогенізованої пухлинної тканини екстрагували фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2н HClO₄. Потім pH за допомогою ПХЕ доводили до 7,6-8,0, дивалентні іони видаляли за допомогою Chelex 10мг/5мл (Sigma. США), фільтрували, ліофілізували та зберігали при температурі -20°C. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹P ЯМР спектрометрі зразки розчиняли в 1,0мл D₂O, центрифугували і переносили в ЯМР-пробірки для аналізу.

Сpektри ПХЕ реєстрували на ЯМР-спектрометрі, використовуючи 5мм кювети. Сpektри вимірювали при 161.976 MHz, зі спектральною шириною в 64724.9 Hz, шириною імпульсу 90° та затримкою в 4сек. Тринатрієва сіль метилендіфосфонієвої кислоти (Sigma) правила за стандарт. Всі ³¹P-хімічні зрушення у спектрах співвідносили до сигналу ФК, який позначався як 0,0ppm. Співвідношення PME/Pi дорівнювало 1,0, тобто, було менше, ніж 1,4, що вказує на гіпоксичність пухлини.

Концентрації активних та латентних форм ММП-2 та -9 в зразку гомогенізованої пухлинної тканини визначали методом зимографії в 12% ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1% желатину в якості субстрату [11]. 50мг пухлинної тканини гомогенізували в 1% розчині додецилсульфату натрію, гомогенат центрифугували при 3000об/хв., 20мкл надосаду вносили в лунки геля та проводили електрофорез при температурі +4°C, в напрузі електричного поля 150V, протягом 4 годин. Після розділення досліджуваних білків гель відмивали в 2,5% розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з додаванням хлориду кальцію (pH=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37°C, фіксували та забарвлювали 0,25% Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність ММП-2 та -9 візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі. а їхня локалізація відповідала молекулярній масі кожного із ферментів, які визначалися за стандартами молекулярних мас.

Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису та визначали концентрації активних форм ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротейназ. Концентрація активних форм ММП-2 становила 3,6мкг/г тканини, а ММП-9 - 17,0мкг/г тканини, що більше, ніж 2,0 та 4,5мкг/г тканини,

відповідно, тому наведені показники вважаються високими.

Імуногістохімічне виявлення експресії білка CD34 проводили з використанням відповідних моноклональних антитіл CD34 (клас II, клон QBEnd, "DakoCytomatuion", Данія) в розведенні 1:100 на депарафінізованих зрізах пухлинної тканини. Для виявлення експресії CD34 на зрізи наносили 1% розчин сироваточного альбуміну бика, потім проводили інкубацію препаратів з відповідними моноклональними антитілами в оптимальному розведенні протягом однієї години. Після промивання препаратів у розчині фосфатного буфера їх інкубували 40 хвилин у полімерному розчині. Для візуалізації активності пероксидази використовували DAB ("DakoCytomation", Данія) та дофарбовували зрізи гематоксином Майєра. За допомогою світлового мікроскопа візуалізували клітини, що експресують CD34, як клітини, забарвлені коричневим кольором.

Кількість забарвлених клітин становила 165, що більше, ніж 142, і свідчить про те, що пухлина гіперваскуляризована.

Таким чином, в КМ хворої Ш. виявлені ДПК, а пухлина характеризується як гіпоксична, гіперваскуляризована, з високими рівнями активності желатиназ. За цих умов прогноз перебігу захворювання є несприятливим. Тривалість життя хворої становила 40 тижнів.

ІІ. Хворий К., 1952 року народження (Історія хвороби № 3752, АК №8344/05. ПГЗ №12808-16/05 - залізистий, місцями персеподібний рак шлунка. Т₃N₁M₀. G3-4. стадія IIIA). Виконана операція - розширена гастректомія за Гіляровичем.

За 1-2 доби до оперативного втручання в результаті стандартної процедури пункції КМ із стеральної кістки хворого отримували пунктат КМ, з якого виділяли моноклеарні клітини та зберігали їх при температурі -20°C до часу використання. Моноклеарні клітини наносили на скельця в процесі центрифугування на цитоцентрифузі впродовж 10сек. при 1500об/хв. Виявлення наявності цитокератин-позитивних клітин серед моноклеарів КМ на цитоспінових препаратах здійснювали, використовуючи метод APAAP та систему візуалізації EnVisionTM G/2 System/AP Rabbit/Mouse (Permanent Red) ("Dako Cytomation", Данія). Як первинні антитіла використовували моноклональні мишачі антитіла проти цитокератину (клон AE1/AE3, "DakoCytomation", Данія). Дофарбування ядер здійснювали 0,1% розчином метилового зеленого. В результаті дослідження препарату під світловим мікроскопом на ньому не були виявлені забарвлені червоним клітини на зеленому тлі, тобто в КМ хворого відсутні ДПК.

Частину пухлинної тканини, отриманої у вказаного пацієнта під час оперативного втручання, одразу занурювали в забуферений формалін, після чого готували парафінові блоки за стандартною методикою. Парафінові блоки за допомогою мікротома нарізали на зрізи товщиною 4-6мкм, які наносили на предметне скло. Іншу частину пухлинної тканини, отриманої під час операції, зберігали в рідкому азоті при температурі -180°C не більше, ніж 1 місяць.

Отриману під час операції тканину, що зберігалась в рідкому азоті, гомогенізували і розділяли на два зразки.

З метою визначення РМЕ/Рі методом ЯМР-спектроскопії [7] із зразка гомогенізованої пухлинної тканини екстрагували фосфорвмісні речовини розчином холодної 1,2н НClO₄. Потім рН за допомогою ПХЕ доводили до 7,6-8,0, дівалентні іони видаляли за допомогою Chelex 10мг/5мл (Sigma, США), фільтрували, ліофілізували та зберігали при температурі -20°C. Перед реєстрацією спектрів ПХЕ на ³¹P ЯМР спектрометрі зразки розчиняли в 1,0мл D₂O, центрифугували і переносили в ЯМР-пробірки для аналізу.

Сpektри ПХЕ реєстрували на ЯМР спектрометрі, використовуючи 5 мм кювети. Сpektри вимірювали при 161,976 MHz, зі спектральною шириною в 64724,9 Hz, шириною імпульсу 90° та затримкою в 4сек. Тринатрієва сіль метилендіфосфонієвої кислоти (Sigma) правила за стандарт. Всі ³¹P-хімічні зрушення у спектрах співвідносили до сигналу ФК, який позначався як 0,0ppm.

Співвідношення РМЕ/Рі дорівнювало 1,8, тобто, було більше, ніж 1,4, що вказує на те, що пухлина добре оксигенована.

Концентрації активних та латентних форм ММП-2 та -9 в зразку гомогенізованої пухлинної тканини визначали методом зимографії в 12% ПААГ з додецилсульфатом натрію і 0,1% желатину як субстрат [11]. 50мг пухлинної тканини гомогенізували в 1% розчині додецилсульфату натрію, гомогенат центрифугували при 3000об/хв, 20мкл надосаду вносили в лунки геля та проводили електрофорез при температурі +4°C, в напрузі електричного поля 150V, протягом 4 годин. Після розділення досліджуваних білків гель відмивали в 2,5% розчині тритону X-100. потім інкубували в буфері з додаванням хлориду кальцію (рН=7,5) впродовж 18 годин при температурі +37°C. фіксували та забарвлювали 0,25% Кумассі діамантовим синім. Після відмивання гелю у розчині оцтової кислоти з метанолом протеолітична активність ММП-2 та -9 візуалізувалась у вигляді знебарвлених смужок на синьому тлі, а їхня локалізація відповідала молекулярній масі кожного із ферментів, які визначалися за стандартами молекулярних мас.

Оцінку протеолітичної активності проводили шляхом виміру площі зони лізису та визначали концентрації активних форм ферментів, використовуючи стандартний набір матриксних металопротейназ. Концентрація активних форм ММП-2 становила 0,3мкг/г тканини, а ММП-9 - 0,9мкг/г тканини, що менше ніж 2,0 та 4,5мкг/г тканини, відповідно, тому наведені показники вважаються низькими.

Імуногістохімічне виявлення експресії білка CD34 проводили з використанням відповідних моноклональних антитіл CD34 (клас II, клон QBEnd, "DakoCytomatuion", Данія) в розведенні 1:100 на депарафінізованих зрізах пухлинної тканини. Для виявлення експресії CD34 на зрізи наносили 1% розчин сироваточного альбуміну бика, потім проводили інкубацію препаратів з відповідними моноклональними антитілами в оптимальному розведенні протягом однієї години. Після проми-

вання препаратів у розчині фосфатного буфера їх інкубували 40 хвилин у полімерному розчині. Для візуалізації активності пероксидази використовували DAB ("DakoCytomation", Данія) та дофарбовували зрізи гематоксилином Майєра. За допомогою світлового мікроскопа візуалізували клітини, що експресують CD34, як клітини, забарвлені коричневим кольором. Кількість забарвлених клітин становила 110, що менше ніж 142, і свідчить про те, що пухлина гіповаскуляризована.

Таким чином, в КМ хворого К. не виявлені ДПК, а пухлина характеризується як добре окисенована, гіповаскуляризована, з низькими рівнями активності желатиназ. За цих умов прогноз перебігу захворювання сприятливий. Тривалість життя хворого становила 127 тижнів.

Джерела інформації:

1. Macdonald J.S., Cervantes A. New horizons for gastric cancer: commentary // *Eur. J. Cancer Suppl.* - 2006. - Vol. 4, №10. - P.1-2.

2. Muller V., Alix-Panabieres C. Pantel K. Insight into minimal residual disease in cancer patient: Implication for anti-cancer therapies // *Eur. J. Cancer* - 2010. -Vol. 46.-P.1189-1197.

3. Circulating tumor cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype / K. Ameri, R. Luong, H. Zhang et al. // *Br J Cancer.* - 2010. -Vol.102. - P.561-569.

4. Clinical significance of micrometastasis in bone marrow of patients with gastric cancer and its relation

to angiogenesis / Y. Kakeji, y. Maehara. K. Shibahara et al. // *Gastr Cancer.* - 1999. - Vol. 2. - P.46-51.

5. Hoeckel M., Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects // *J. NatL Cancer Inst.* - 2001. - Vol. 93. - P.266-276.

6. Eriksen J.G., Horsman M.R. Tumor hypoxia - a characteristic feature with a complex molecular background // *Radiother. Oncol.* - 2006. - Vol. 81. - P.119-121.

7. Correlation between ³¹P-NMR spectroscopy and tissue Cb tention measurements in a murine fibrocarcoma /P. Vaupel, P. Okunieff. F. Kallinowski et al. // *Radiation Res.* - 1989. - Vol. 120. - P.477-493.

8. Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis // *Front Biosci* - 2006. - Vol. 11. - P.479-491.

9. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer / F. Kubben, C. Sier, W. Duijn et al. // *Br J Cancer* - 2006. - Vol. 94. - P.1035 -1040.

10. Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow / M.Heiss, E. Simon, B.Beyer at al. // *J. Clin. Oncol.* - 2002. - Vol.20. - P.2005-2016 (прототип).

11. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / YA. De Clerk, N. Perez. H. Shimada et al. // *Cancer research.* - 1992. - Vol. 52. - P.701-708.