

ТОМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ

На правах рукописи

Авдеенко

Татьяна Владимировна

**РОЛЬ ИНФЕКЦИОННОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО
КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА ПРИ ДИСПЛАЗИИ И РАКЕ ЖЕЛУДКА**

14.01.12 – онкология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Эпидемиология рака желудка: современное состояние проблемы.....	12
1.2. Роль НР-инфекции в развитии предраковых заболеваний и рака желудка.....	14
1.3. Характеристика воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка, связь с НР-инфекцией.....	16
1.4. Клеточный состав воспалительного инфильтрата при раке желудка.....	19
1.5. Вирус Эпштейна-Барр и рак желудка: поиск и анализ вирусологических и молекулярно-биологических маркеров, связь с НР-инфекцией и составом клеточного инфильтрата.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Характеристика клинического материала.....	30
2.2. Инструментальные методы исследования желудка.....	35
2.3. Морфологические методы исследования.....	36
2.4. Морфологический метод детекции <i>H. Pylori</i>	36
2.5. Метод получения и анализа ДНК вируса Эпштейна-Барр из опухолевой ткани желудка.....	37
2.6. Определение специфических антител к антигенам литической инфекции вируса Эпштейн-Барр (IgG и IgA к вирусному капсидному антигену и IgG к комплексу ранних антигенов) в сыворотке крови больных с предопухоловой патологией и раком желудка.....	38

2.7. Статистические методы исследования.....	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
3.1. Частота встречаемости специфических иммуноглобулинов к ВЭБ в сыворотке крови у больных с диспластическими и метапластическими изменениями СОЖ.....	41
4	
3.2. Частота встречаемости специфических иммуноглобулинов к ВЭБ в сыворотке крови больных раком желудка	45
3.3. Инфицированность слизистой оболочки желудка <i>Helicobacter pylori</i> больных с диспластическими изменениями и раком желудка в зависимости от степени вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах и противовирусного гуморального иммунитета.....	53
3.4. Взаимосвязь <i>Helicobacter pylori</i> -инфекции с составом клеточного инфильтрата у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и раком желудка.....	59
3.5. Состав воспалительного инфильтрата у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка в зависимости от показателей противовирусного гуморального иммунитета и вирусной нагрузки ВЭБ.....	62
3.6. Прогностическая значимость состояния гуморального иммунитета к ВЭБ и уровня вирусной нагрузки, а также инфицированности <i>Helicobacter pylori</i> у больных раком желудка.....	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	80
ВЫВОДЫ.....	84
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ВН – вирусная нагрузка

ВКА – вирусный капсидный антиген (вируса Эпштейна-Барр)

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения;

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр;

ДПК – двенадцатиперстная кишка;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

ИЛ – интерлейкин;

КМ – кишечная метаплазия;

ЛФ - лимфоциты

МИФ - фактор, ингибирующий миграцию макрофагов;

МФ – макрофаги

НФ – нейтрофилы

ПЦ - плазмоциты

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты;

РА – ранние антигены вируса Эпштейна Барр;

СОЖ – слизистая оболочка желудка;

ЭО – эозинофилы;

EBER – малые вирусные РНК ВЭБ

EBNA-LP, EBNA-1 и EBNA-2 – ядерные белки ВЭБ

HP –Helicobacter pylori;

LMP-1, LMP-2A, LMP-2B – мембранные белки вируса

pH – водородный показатель.

ВВЕДЕНИЕ

По данным за 2014 год в России ежегодно диагностируется 45-49 тысяч первичных случаев рака желудка, и, несмотря на продолжающееся снижение стандартизированных показателей заболеваемости и смертности, одногодичная летальность остается стабильно высокой – 49,2-51% [11].

Известно, что развитию опухоли предшествует нарушение роста и дифференцировки клеток. Одним из факторов риска может стать хроническое воспаление, поскольку на его фоне происходят такие предопухолевые морфологические перестройки, как метаплазия и дисплазия эпителия желудка [23]. К предопухолевым заболеваниям желудка с высоким риском развития рака относят хронический атрофический гастрит, сочетающийся с диспластическими или (и) метапластическими изменениями в слизистой оболочке. Наряду с опасными в плане гастроканцерогенеза экзогенными факторами (профессиональные вредности, курение, алкоголизм, неправильное питание), наиболее значимым признано хроническое носительство потенциально онкогенной бактерии *Helicobacter pylori* (НР).

Во всех случаях хеликобактериоза имеет место – воспаление слизистой оболочки желудка (СОЖ) с преимущественно лимфо-плазмочитарным характером инфильтрата, развивающееся вслед за адгезией микроорганизма на эпителии. Известно, что НР инициирует апоптоз клеток СОЖ, и компенсаторному усилению пролиферативной активности в герминативных зонах СОЖ. Таким образом, НР вызывает определенные нарушения в клеточном обновлении, приводящие к атрофии СОЖ, дисплазии, кишечной метаплазии (КМ) – основным составляющим предрака желудка [4, 2, 23, 62]. Подтверждением являются данные о том, что около 70% аденокарцином желудка сочетаются с НР-ассоциированным хроническим гастритом, при этом развивается карцинома кишечного типа [6, 23], в то время как рак диффузного типа, по-видимому, не связан с НР-инфекцией [18]. Несмотря на то, что роль НР в возникновении значительной части случаев рака желудка и MALT-лимфом желудка практически доказана, остается много

неясных вопросов относительно не только роли этой бактерии в опухолевой трансформации, но и возможного влияния на опухолевую прогрессию. Не ясна роль НР в развитии кардиального рака.

Известно, что одним из факторов, инициирующих хроническое воспаление в СОЖ, является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), который может персистировать в организме в течение всей жизни, локализуясь в основном в В-лимфоцитах. Статистика показывает, что ежегодно в мире регистрируется более 50000 новых случаев ВЭБ-положительных опухолей желудка, однако остается открытым вопрос об этио-патогенетической роли данного вируса в их развитии [71]. В многочисленных исследованиях показано, что в злокачественных клетках различных ВЭБ-ассоциированных опухолей, в том числе и рака желудка, вирус находится в латентном состоянии. Обнаружено 11 генов латентной инфекции ВЭБ, кодирующие малые неполиадениловые РНК (EBER-1 и EBER-2), ядерные (EBNA-1, -2, 3А, -3В,-3С,-LP) и мембранные белки вируса (LMP-1, LMP-2А, LMP-2В). Доказано, что часть из перечисленных белков принимают участие в злокачественной трансформации инфицированных клеток, при этом такие онкомаркеры ВЭБ, как EBERs-положительные ткани и белок Lmp-2, выявлены в эпителиальных клетках СОЖ у 24% больных хроническим атрофическим гастритом [14, 26].

Имеются данные о связи высокого уровня гуморального иммунитета к белкам ВЭБ с присутствием генетической информации ВЭБ в опухолевых клетках желудка [10].

Таким образом, не вызывает сомнений актуальность изучения роли ВЭБ и хронической хеликобактерной инфекции в гастроканцерогенезе. Оба инфекционных агента вызывают хроническое воспаление, персистировать в организме пожизненно и могут изменять иммунный контроль. Однако механизмы вовлеченности НР и ВЭБ и их взаимодействие в ходе гастроканцерогенеза изучены недостаточно, требует анализа их влияние на состав воспалительного инфильтрата и выраженности гуморального противовирусного иммунитета.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучить роль инфекционной составляющей и воспалительного клеточного инфильтрата в развитии диспластических процессов и рака желудка.

Задачи исследования

1. Изучить частоту встречаемости специфических иммуноглобулинов к вирусу Эпштейна-Барр в сыворотке крови и зависимость морфологических изменений от их титра у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка.
2. Определить частоту встречаемости специфических иммуноглобулинов к вирусу Эпштейна-Барр в сыворотке крови больных раком желудка и оценить связь их титров с локализацией и гистотипом опухоли.
3. Оценить особенности гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр при инфицировании слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* у больных с диспластическими изменениями и раком желудка.
4. Выявить особенности воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке больных с диспластическими изменениями и раком желудка в зависимости от состояния гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр.
5. Оценить прогностическую значимость уровня вирусной нагрузки, гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр и инфицированности *Helicobacter pylori* у больных раком желудка.

Научная новизна

Впервые показано, что у больных с диспластическими изменениями СОЖ титр IgG к ВКА нарастает по мере усиления активности воспаления в СОЖ, а высокие титры всех противовирусных иммуноглобулинов () ассоциированы с наличием НР-инфекции, что свидетельствует об однонаправленном действии *Helicobacter pylori* и вируса Эпштейна-Барр при развитии преопухолевого патологического процесса. У больных раком желудка выявлена связь наличия высокого титра IgG к ВКА ($\geq 1:320$) в сыворотке крови и высокой вирусной нагрузки ($\lg\text{EBV}/10^5$

более 3) в опухолевой ткани с отсутствием НР-инфекционирования СОЖ. Впервые показано, что высокий титр IgA к ВКА ВЭБ ассоциируется с локализацией рака в кардиальном отделе и теле желудка, а отсутствие IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови у больных раком желудка III-IV стадии является благоприятным прогностическим признаком в плане общей выживаемости.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты исследования позволяют расширить теоретические представления о роли *Helicobacter pylori* и вируса Эпштейна-Барр в патогенезе преопухолевых изменений и рака желудка.

Результаты исследования формируют новые представления о взаимосвязи состояния специфического иммунитета к ВЭБ, вирусной нагрузки к ВЭБ и НР-инфицированности с составом воспалительного инфильтрата и локализацией патологического процесса у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка.

Данные по концентрации IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови больных раком желудка III-IV стадии могут быть использованы в качестве дополнительного прогностического критерия.

Согласно полученным результатам, повышение уровня IgG к ВКА можно рассматривать как прогностический критерий прогрессирования предопухолевой патологии желудка.

Наличие высоких титров IgA к ВКА может использоваться как критерий формирования группы повышенного риска по раку желудка с локализацией в кардиальном отделе и теле желудка.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Развитие диспластических процессов и рака желудка сопровождается гуморальными реакциями на ВЭБ; титр противовирусных антител зависит от выраженности морфологических изменений в слизистой оболочке желудка.

2. Взаимоотношения инфицированности *Helicobacter pylori*, уровня специфического противовирусного иммунитета к ВЭБ и вирусной нагрузки при диспластических изменениях СОЖ и раке желудка носят противоположный характер.

3. Выявление высоких титров антител к ВЭБ в сыворотке крови больных в диспластическими процессами СОЖ ассоциировано с нарастанием эозинофильно-плазмоцитарной инфильтрации, у больных раком желудка – со снижением количества эозинофилов, плазмоцитов и нейтрофилов и увеличением доли лимфоцитов в инфильтрате; появление IgG к РА у больных раком ассоциировано с худшим прогнозом общей выживаемости.

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены и обсуждены на IV Всероссийской научно-практической конференции «Инноватика 2008», 2008, Томск; на научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндоскопии в профилактике и лечении онкологических заболеваний», 2008, Томск; на V областной научно-практической конференции «Предопухолевые заболевания органов пищеварения», 2008, Томск; на Российской научно-практической конференции с международным участием «Современная онкология: достижения и перспективы развития», Томск, 2009; на научно-практической конференции «Инновации РАН – 2009», 2009, Томск; на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 65-летию онкологической службы Красноярского края, 2010, Красноярск; на VI региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева; 2011г, Томск; на Седьмом съезде онкологов и радиологов стран СНГ, Астана, 2012.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 17 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК для представления результатов диссертационных работ.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в учебном процессе для студентов и клинических ординаторов при изучении вопросов, посвященных патогенезу рака желудка на кафедре онкологии СибГМУ, а также внедрены в работу эндоскопического отделения Томского НИИ онкологии для прогнозирования течения рака желудка.

Личный вклад автора

Анализ данных литературы по теме диссертации, планирование исследования, формулировка цели, задач исследования, научной новизны и практической значимости работы, проведение эндоскопического исследования больных клинических групп, анализ результатов, статистическая обработка результатов исследований и написание диссертационной работы выполнено лично автором.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 100 страницах и иллюстрирована 7 рисунками и 25 таблицами. Библиография включает 102 литературных источника, из которых 46 отечественных и 56 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология рака желудка: современное состояние проблемы

Рак желудка, по данным ВОЗ, по распространенности среди злокачественных новообразований занимает 2-е место в мире, уступая лишь раку легкого, и остается одной из ведущих причин смертности от онкологической патологии во всем мире [12].

Заболеваемость раком желудка колеблется в достаточно широких пределах. Так, по данным Мерабишвили В.М. максимальная частота заболеваемости РЖ отмечена у мужчин Японии (114,7), а минимальная - у белых женщин США (3,1) [28]. Япония и Россия по заболеваемости раком желудка занимают лидирующее положение в мире. Так, в Японии этот показатель достигает 75 на 100 тысяч, а в России в 2002 году этот показатель составил 32,2 на 100 тысяч населения [27, 43]. В последнее время благодаря изменениям пищевого рациона, методик приготовления и хранения пищи, частота этого заболевания в экономически развитых странах постепенно снижается, в том числе, и в Российской Федерации [46].

В 2010 году в структуре онкологической заболеваемости среди мужского населения России рак желудка занимал третье место (9,1%), уступая опухолям трахеи, бронхов и легкого (18,9%) и предстательной железы (11,9%). Первое место по распространенности в женской популяции принадлежит новообразованиям молочной железы (20,5%), далее следуют опухоли кожи (14,4%), рак тела матки (7,1%), рак ободочной кишки (6,9%) и желудка (6,2%) [12]. Ведущими формами злокачественных новообразований в структуре онкологической заболеваемости мужского населения Томской области за период с 2000-2011 гг. являются: рак легкого (21,0%), рак предстательной железы (13,7%), рак желудка (7,8%), а среди женского населения Томской области – рак молочной железы (20,8%), рак ободочной кишки (7,1%) и рак желудка (6,6%). Заболеваемость раком желудка в Томской области, среднем, на 10% выше, чем по

Российской Федерации, как среди мужского, так и среди женского населения [35, 36].

В 1998 году в России показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями желудка на 100 тысяч населения составил у мужчин - 35,5, а у женщин - 15,4; в 2002 году этот показатель был на уровне 32,3 и 13,6, соответственно. По сравнению с 1998 годом в 2002 году отмечается снижение показателей прироста заболеваемости у мужчин – на 9,1% и у женщин – на 11,6% [27, 15]. По данным за 2008 год, в России ежегодно диагностируется 45-49 тысяч первичных случаев рака желудка, причем, несмотря на продолжающееся снижение стандартизированных показателей заболеваемости и смертности, показатель одногодичной летальности остается стабильно высоким – 49,2-51% [11, 43].

Местно распространенный опухолевый процесс на момент обращения имеют около 70% больных, у 60 – 90% больных заболевание выявляется в III-IV стадии, при этом удельный вес IV стадии не имеет тенденции к снижению. Подобная ситуация является результатом поздней диагностики заболевания. Самая высокая пятилетняя выживаемость при раке желудка зарегистрирована в Японии – 53%, тогда как в других странах – значительно ниже. Применительно к злокачественным новообразованиям желудка, в 2002 году по сравнению с 2000 годом, возросла доля больных, выявленных активно (4,0% против 3,5% в 2000 году). В целом показатели активного выявления злокачественных новообразований в России неадекватны современным возможностям медицины и свидетельствуют о необходимости проведения специальных скрининговых программ.

Кроме Японии программы скрининга рака желудка не работают нигде. Первичной профилактике РЖ мешают отсутствие четкого специфического причинного фактора, мультифакторная природа рака желудка и высокая стоимость скрининговых программ [7, 15, 18, 19].

В настоящее время доказано, что массовый эндоскопический скрининг и обоснованный отбор лиц в группы повышенного онкологического риска является ключом к решению проблемы ранней диагностики рака желудка. Показано, что рутинные методы обследования практически не позволяют распознать заболевание на ранних стадиях. Это делает актуальным поиск чувствительных и специфичных методов диагностики, базирующихся на выявлении вовлеченных в формирование и прогрессию рака желудка биологических маркеров [1, 18]. Тщательное и расширенное обследование позволит сформировать группы лиц, имеющих повышенный риск, что улучшит выявление злокачественного заболевания на ранней стадии [24, 32, 33, 40].

1.2. Роль НР-инфекции в развитии предраковых заболеваний и рака желудка

Хеликобактериоз является так называемой “медленной инфекцией”, что обусловлено длительным, практически пожизненным персистированием возбудителя в организме человека, его способностью взаимодействовать с иммунной системой и адаптироваться к ее изменениям.

Показано, что во всех случаях хеликобактериоза имеет место общий механизм – воспаление СОЖ, развивающееся вслед за адгезией микроорганизма на эпителии. Нейтрофильная инфильтрация эпителия и собственной пластинки СОЖ индуцируется посредством 2 механизмов – непосредственно НР (через выделение растворимого белка, активирующего нейтрофилы) и опосредованно через экспрессию эпителиоцитами интерлейкина 8 (ИЛ-8) с последующим запуском всего провоспалительного каскада. Белок, активирующий нейтрофилы, есть у всех известных штаммов НР, что объясняет наличие нейтрофильной инфильтрации у 100% инфицированных. Феномен хемотаксиса нейтрофилов после активации ИЛ-8 цитокинового каскада более выражен у CagA-, VacA-

позитивных штаммов, при этом выраженность инфильтрации коррелирует со степенью обсеменения [23].

Также важно, что НР, инициируя апоптоз клеток СОЖ, приводит к компенсаторному усилению пролиферативной активности в герминативных зонах СОЖ. Таким образом, НР способен вызывать определенные нарушения в клеточном обновлении, приводящие к атрофии СОЖ, дисплазии, кишечной метаплазии (КМ) – основным формам предрака желудка [2, 4, 23,29, 34, 62].

Исследования показали, что около 70% аденокарцином желудка связаны с НР-ассоциированным хроническим гастритом, при этом развивается карцинома кишечного типа [6, 23, 31]. Рак диффузного типа, по-видимому, не связан с НР-инфекцией, поскольку расшифрована генетическая природа этого заболевания – мутация гена E-кадгерина [18]. В то же время связь НР и кардиального рака остаются недостаточно изученными. Существует даже предположение о том, что эрадикация возбудителя способствует повышению риска развития рака этой локализации.

В целом показано, что успешная эрадикация НР при хронических заболеваниях желудка приводит к значительному уменьшению нейтрофильной инфильтрации, обратному развитию атрофии СОЖ, регрессу КМ и дисплазии (обычно легкой степени), однако это происходит преимущественно в теле желудка и только у части больных. Регресса изменений СОЖ, вызванных НР, в антральном отделе желудка обычно не происходит [17, 22, 23, 33, 45, 41, 95]. Однако большинство специалистов сходятся во мнении, что эрадикация НР приводит к прекращению прогрессирования и распространения атрофии СОЖ.

Определенный интерес вызывает исследование М.А. Сеньчуковой с соавт. (2009), в котором была изучена инфицированность НР больных раком желудка в Оренбургской области (по данным уреазного теста). Согласно полученным результатам, инфицированность НР составила 83%. Наибольшая бактериальная обсемененность отмечена в ближайших к опухоли участках СОЖ, наименьшая – в

самой опухоли. У обследованных больных уреазная активность определялась не только в СОЖ, но и в реактивно измененных лимфоузлах и в сальнике, что, возможно, связано со способностью НР к транслокации. Ни в одном из метастатически пораженных лимфатических узлов уреазная активность не выявлялась [13].

Таким образом, приведенные литературные данные позволяют предполагать определенную роль НР в развитии предраковых заболеваний желудка и рака желудка кишечного типа. Однако, значение НР в опухолевой прогрессии и прогнозе остается неизученным.

1.3. Характеристика воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка, связь с НР-инфекцией

В норме в межпищеварительный период инфильтрация СОЖ незначительна. В современной классификации хронических гастритов отмечено, что в неизменной слизистой оболочке нет даже минимальной инфильтрации; если же она появляется, то это свидетельствует о гастрите. Это требование касается слизистой оболочки фундального отдела желудка. В антральном отделе плазмоциты и лимфоциты встречаются почти в каждом биоптате [3, 4, 22, 45].

В состав инфильтрата СОЖ входят плазматические клетки, лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы и тканевые базофилы, являющиеся составной частью иммунной системы слизистой оболочки [20, 21]. Как правило, это является проявлением иммунного ответа, возникающего на персистенцию *H. pylori*, что получило название - *H. pylori*-ассоциированных заболеваний желудка. Инфильтрация собственной пластинки СОЖ является проявлением воспаления и происходит преимущественно за счет плазматических клеток, причем соотношение лимфоциты/плазмоциты существенно изменяется при различных формах гастрита [20].

Основным показателем активности хронического гастрита является инфильтрация нейтрофилами. Активный хронический гастрит характеризуется инфильтрацией полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ) собственной пластинки и эпителия СОЖ на фоне свойственной хроническому гастриту инфильтрации плазматическими клетками и лимфоцитами. В зависимости от выраженности нейтрофильной инфильтрации выделяют степени активности хронического гастрита. При 1-ой степени имеется умеренная лейкоцитарная инфильтрация собственной пластинки СОЖ, при 2-ой захватывается как поверхностный, так и ямочный эпителий. При 3-ей степени наблюдаются внутриямочные абсцессы. Таким образом, хронический активный гастрит сопровождается не только нейтрофильной инфильтрацией, но и повреждением эпителия СОЖ [30, 31].

ПЯЛ отводится большая роль в повреждении СОЖ при НР-инфекции. Хемотаксис нейтрофилов стимулируют факторы, синтезируемые НР - уреазы, липополисахариды [34]. Доказана возможность активного повреждения эпителия желудка протеазами нейтрофилов [24], активность которых зависит от медиаторов воспаления.

Главным стимулятором хемотаксиса нейтрофилов являются активированные геликобактериями эпителиоциты желудка, экспрессирующие цитокины, лейкотриен В₄, продукты активации комплемента. При этом ведущая роль принадлежит ИЛ-8. В качестве ключевого фактора, определяющего характер гастрита и риск неопластической трансформации, недавно был предложен ИЛ-1 β , синтез которого индуцируется НР, который известен как мощный провоспалительный цитокин и ингибитор секреции желудочной слизи. Кластер ИЛ-1 (ген, кодирующий ИЛ-1 β и ген, кодирующий антагонист рецептора ИЛ-1 β) содержит ряд функционально значимых полиморфизмов, которые могут быть соотнесены с высокой или низкой продукцией ИЛ-1 β [60]. El-Omar E. et al. (2000) впервые сообщили об определенных генотипах в этом кластере, которые ассоциируются с повышенным риском развития рака желудка [73].

Тканевые макрофаги являются важными функциональными клетками СОЖ. В исследованиях Asim M. (2010) было показано, что НР индуцирует апоптоз макрофагов [47]. Oguma K. (2008) было показано, что НР-инфекция ассоциирована с макрофагальной инфильтрацией и накоплением бета-катенина в ядре этих клеток [86].

Эозинофилы и тучные клетки участвуют в иммунном ответе на НР, но их роль в гастроканцерогенезе точно не установлена. По данным Piazeelo M. (2008) плотность эозинофилов с СОЖ была гораздо выше у субъектов с высоким риском РЖ, по сравнению с пациентами с низким риском. При наличии КМ или дисплазии плотность эозинофилов прогрессивно возрастала, но только у больных с высоким риском малигнизации. Аналогичная зависимость наблюдалась и в отношении плотности тучных клеток. исследователи предполагают, что эозинофилы и тучные клетки играют двойственную роль: в области с низким риском рака желудка повышенная плотность эозинофилов, по-видимому, ассоциирована с преимущественно Th2-ответом и канцеропротективным эффектом; в области с высоким риском эозинофилы, наоборот, по-видимому, способствуют Th1-иммунному ответу в СОЖ, что ассоциировано с развитием предраковых изменений [61, 64]. Однако, безусловно, необходимо проведение дополнительных исследований, посвященных изучению роли эозинофилов и тучных клеток в гастроканцерогенезе.

Таким образом, клеточный состав воспалительного инфильтрата СОЖ претерпевает значительные изменения при инфицированности НР, развитии атрофического гастрита, дисплазии различной степени тяжести или КМ. Изменения эти в значительной степени неспецифичны, и в плане риска развития рака желудка, по-видимому, должны интерпретироваться во взаимосвязи с другими факторами и показателями, вовлеченными в патогенез предраковых изменений СОЖ.

1.4. Клеточный состав воспалительного инфильтрата при раке желудка

При изучении клеточного состава воспалительного инфильтрата большое внимание кроме ПЯЛ уделяют тканевым макрофагам, активированным лимфоцитам, тучным клеткам. В воспалительном инфильтрате преобладают, как правило, лимфоциты.

На примере клеточных линий рака желудка было показано, что фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (МИФ), который продуцируется активированными Т-лимфоцитами, увеличивает пролиферацию клеток рака желудка, индуцирует экспрессию циклина D1 на транскрипционном уровне и ингибирует экспрессию p27 на посттранскрипционном уровне [78]. МИФ также может рассматриваться в качестве потенциального диагностического (с чувствительностью, специфичностью и точностью соответственно, 82, 92 и 89%) и прогностического маркера. Так при сывороточном уровне МИФ более 6600 пг/мл 5-летняя выживаемость была достоверно ниже, по сравнению с больными, концентрация маркера которых был ниже этого показателя [93].

При использовании современных методов исследования, и в частности протеомного анализа, было показано, что тканевой уровень человеческого нейтрофильного пептида 1-3, обладающего эндогенной антимикробной и антивирусной активностью, и МИФ, поддерживающего опухолевый ангиогенез, в ткани рака желудка были выше, соответственно, в 10 и 5 раз по сравнению с доброкачественной патологией желудка, что также показывает потенциальную перспективность исследования этих маркеров для диагностики [85]. При сравнительном исследовании МИФ в сыворотке и тканях больных с предраком и раком желудка было показано, что его содержание в обоих биологических субстратах нарастает прогрессивно по мере развития НР-индуцированного гастрита, присоединения КМ и дисплазии с максимальными цифрами при раке желудка. [69]. Выявлена четкая прямая зависимость между уровнем экспрессии МИФ в аденокарциномах желудка, стадией заболевания и плотностью микрососудов [92].

Некоторые авторы выделяют особую форму рака желудка – богатый лимфоцитами рак желудка, причем эта форма рака ассоциирована с хорошим прогнозом. Grogg K.L.(2003) изучил взаимосвязь лимфоидной инфильтрации в опухолях желудка с наличием микросателлитных нестабильностей, гистотипом и степенью дифференцировки опухолей и выживаемостью. При проведении однофакторного анализа было выявлено, что риск смерти от рака желудка ниже при большом количестве лимфоидных клеток в инфильтрате и высокой частоте микросателлитных нестабильностей в опухолевых клетках [81].

В исследованиях Zhang H. (2007) была выявлена высокая экспрессия макрофагальной металлоэластазы в опухолях желудка. Позитивные по данному ферменту опухоли имели меньшую частоту метастатического поражения региональных лимфоузлов, по сравнению с негативными опухолями, а двухлетняя общая выживаемость также была выше в позитивных опухолях по сравнению с негативными [102].

В исследованиях Ohno S. (2003) было выявлено, что количество опухоль-инфильтрирующих макрофагов является хорошим предиктором выживаемости. Их количество строго коррелировало со степенью апоптоза опухолевых клеток и количеством Т-хелперов в опухоли. Пятилетняя безрецидивная выживаемость у больных с высокой плотностью опухоль-инфильтрирующих макрофагов была значительно выше, чем у больных с низкой плотностью этих клеток [86]. Созвучные данные представлены в работе Ishigami S. (2003) [98]. Haas M. et al. (2009) в своих исследованиях показал, что при раке кардиального отдела обычно внутриопухолевая инфильтрация лимфоидными и макрофагальными клетками не выражена и не ассоциирована с показателями выживаемости, однако если количество CD4+CD25+FoxP3+ регуляторных Т-лимфоцитов повышено, то больные имели лучшие показатели выживаемости [94].

При ультраструктурном исследовании нейтрофилов в опухолевом инфильтрате было показано, что массивная нейтрофильная инфильтрация

ассоциировалась с активным воспалительным ангиогенезом в строме опухоли [51, 52].

Тучно-клеточная и эозинофильная инфильтрация опухолей желудка также может иметь прогностическое значение [16, 79, 101]. По данным Каракешешевой М.Б. (2008), в опухолях желудка, по сравнению с диспластическими процессами СОЖ, выявлено статистически значимое увеличение числа лимфоцитов, плазмоцитов и нейтрофилов и снижение количества тучных клеток и эозинофилов [16]. В ходе исследований Каракешешевой М.Б. с соавторами (2008) был проведен дискриминантный анализ для оценки риска развития рака желудка у больных с предраковыми изменениями СОЖ. Из параметров, характеризующих состав клеточного инфильтрата, в данную модель вошло количество тучных клеток в инфильтрате. Авторами показано, что высокое число тучных клеток в строме собственной пластинки СОЖ и ряд параметров биохимического состава желудочной слизи позволяют оценить риск развития рака желудка у больных с дисплазией II-III степени с чувствительностью 89% и специфичностью 85% [38].

Интересные исследования были проведены Caruso R. A. с соавт. (2005), в которых изучена роль эозинофильной инфильтрации в опухолях желудка. Ими было изучено 7 случаев рака желудка с массивной эозинофильной инфильтрацией. Несмотря на сходную степень инфильтрации стромы, выраженность дегрануляции эозинофилов была различна. Так в 2 случаях были найдены недегранулированные эозинофилы. В четырех случаях выявлена дегрануляция единичных эозинофилов. В одном случае выявлена выраженная дегрануляция эозинофилов с формированием кристаллов Шарко-Лейдена с последующее секвестрацией этих кристаллов макрофагами, сами эозинофилы имели множественные апоптотические изменения [53, 89].

В исследованиях Caruso R.A. (2009) с использованием световой и электронной микроскопии было изучено 9 случаев папиллярно-тубулярных аденокарцином желудка с гранулематозными разрастаниями с гемorragиями. При типировании воспалительного инфильтрата было выявлено, что основную массу клеток

гранулам составляют CD68-позитивные клетки и эозинофилы. Таким образом, данный вид опухолей можно охарактеризовать как карциномы желудка с макрофагальным инфильтратом, причем на 1 макрофаг было выявлено 1-3 эозинофила [50, 51, 96].

Состав клеточного инфильтрата при различных гистологических вариантах рака желудка был исследован в работе Евтушенко В.А. с соавт. (2008). Развитие диспластических процессов в СОЖ, по сравнению с больными с очаговой атрофией и поверхностным гастритом, сопровождается увеличением в воспалительном инфильтрате числа нейтрофилов на 36%, макрофагов и тучных клеток - в 2 и 9 раз, соответственно, и уменьшением содержания лимфоцитов на 35% и плазмоцитов на 55%, ($p < 0,05$) с изменением соотношения низко- и высокогранулированных форм эозинофилов. По сравнению с дисплазией СОЖ, в строме рака желудка отмечается более высокая воспалительная инфильтрация с увеличением числа лимфоцитов, плазмоцитов и нейтрофилов; для перстневидноклеточного рака характерно более высокое количество нейтрофилов и макрофагов, для аденокарциномы желудка – усиленная лимфоплазмочитарная инфильтрация и низкое число эозинофилов и тучных клеток [44, 99].

1.5. Вирус Эпштейна-Барр и рак желудка: поиск и анализ вирусологических и молекулярно-биологических маркеров, связь с НР-инфекцией и составом клеточного инфильтрата

Вирус Эпштейна-Барр относится к подсемейству γ -герпесвирусов. Его геном представляет собой двойную спираль ДНК, сама спираль - линейной формы. При латентном типе инфекции экспрессируется лишь небольшая популяция кодируемых ВЭБ белков, а вирусный геном в ядрах инфицированных клеток находится в виде низкокопийных ДНК-овых эписом. В многочисленных исследованиях показано, что в злокачественных клетках различных ВЭБ-ассоциированных опухолей, в том числе и эпителиального происхождения (в т.ч. рака желудка), вирус находится в латентном состоянии [15].

К настоящему времени обнаружено 11 генов латентной инфекции ВЭБ: два из них кодируют малые неполиадениловые РНК (EBER-1 и EBER-2), шесть генов кодируют ядерные белки (EBNA-1, -2, 3А, -3В, -3С, -LP) и три – мембранные белки вируса (LMP-1, LMP-2А, LMP-2В). Доказано, что часть из перечисленных белков принимают участие в злокачественной трансформации инфицированных клеток.

Выявлено, что большинство EBERs локализуются в ядре. Обнаружение EBERs в тканях и клеточных линиях методом гибридизации *in situ* является золотым стандартом в идентификации ВЭБ. Среди ядерных белков ВЭБ особо отмечают EBNA-LP, EBNA-1 и EBNA-2. Предполагают, что EBNA-LP необходим для трансформации В-лимфоцитов, поскольку предполагается, что он вовлечен в регуляцию аутокринных факторов, необходимых для роста В-клеток. EBNA-1, по-видимому, необходим для репликации и стабильного сохранения эписомного вирусного генома в латентно инфицированных клетках. EBNA-2, по-видимому, принимает непосредственное участие в трансформации клеток, инфицированных вирусом Эпштейна Барр. Функционально EBNA-2 выполняет роль транс-активатора вирусных генов, включая LMP-1, LMP-2А, LMP-2В. В опытах по трансфекции единичного гена обнаружено, что LMP-1 обладает трансформирующими свойствами. Среди генов продуктивного цикла инфекции выделяют предранние, ранние и поздние гены [15].

Комплекс ранних антигенов (РА), кодируемый геном ВЭБ, появляется во всех клетках, вступающих в продуктивный цикл инфекции, локализуется в цитоплазме и ядре инфицированных клеток. Он состоит из двух компонентов – Р и D. Функции комплекса ранних антигенов недостаточно ясны, однако выявление антител к ранним антигенам ВЭБ у больных имеет определенное диагностическое значение. Было установлено, что при раке носоглотки в сыворотке крови больных присутствуют антитела к Р- и D-компонентам раннего антигенного комплекса с преобладанием анти-D-антител, а у больных лимфомой Беркитта преобладают анти-Р-антитела к ВЭБ [48, 97].

Вирусный капсидный антиген (ВКА) локализуется в ядре и цитоплазме клеток, вступающих в продуктивный цикл инфекции. Это продукт поздних функций вирусного генома. ВКА является структурным белком вирусного капсида. Антитела к этому антигену в высоких титрах выявляются в 100% сывороток больных лимфомой Беркитта и раком носоглотки, а также у значительной части больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. Эпидемиологические исследования показали, что сыворотки практически здоровых людей практически всегда содержат IgG к ВКА в низких титрах. Антитела к комплексу PA в норме у здоровых людей не выявляются, а наличие данных антител свидетельствует о наличии патологического процесса [14].

Интересно, что онкомаркеры ВЭБ (EBERs-позитивные ткани, белок Lmp-2) выявлены на самых ранних этапах патологического процесса в эпителиальных клетках СОЖ у 24% больных хроническим атрофическим гастритом [26].

У взрослых манифестация инфекционного мононуклеоза (наличие высоких титров IgM к ВЭБ, ассоциированное с отсутствием IgG к ВЭБ) может протекать в форме тяжелого гастрита с выраженной лимфоидной инфильтрацией и большим количеством EBERs-позитивных лимфоцитов в СОЖ [55, 66].

В детском возрасте сочетанная НР и лабораторно-подтвержденная ВЭБ инфекция (умеренные и высокие титры IgG и IgM к ВКА) ассоциировались с тяжелым гастритом с выраженной инфильтрацией СОЖ мононуклеарами и ПЯЛ, по сравнению с умеренно-выраженной инфильтрацией при хеликобактериозе [67].

В 2001 году были опубликованы результаты практически единственного проведенного в России исследования, посвященного изучению роли ВЭБ в патогенезе рака желудка [10]. Показано, что частота ВЭБ-позитивного рака желудка в России и Узбекистане составляет 7,3-15,7%. Установлено, что ВЭБ-ассоциированные раки чаще встречаются среди мужчин, принадлежат к низкодифференцированной карциноме с солидным ростом и умеренно дифференцированной тубулярной карциноме, редко локализуются в антральной

части желудка. Показано, что высокая активность гуморального иммунного ответа на белки ВЭБ в 70% случаев коррелирует с присутствием генетической информации ВЭБ в опухолевых клетках этих же больных.

Изучению гуморального ответа на инфицирование ВЭБ посвящено исследование Schetter A J.(2008), в котором была выявлена ассоциация уровня антител к ядерному антигену ВЭБ и антител к ВКА с течением заболевания в когорте пациентов с высоким риском развития рака желудка. Пациенты, у которых в течение 2 лет наблюдения развилась дисплазия СОЖ, имели более высокий титр антител по сравнению с больными, у которых дисплазия не развивалась. Пациенты, у которых уровень соответствующих антител был выше среднего значения в группе, имели более высокую частоту прогрессирования предраковых изменений, по сравнению с больными с уровнем антител ниже среднего [48].

Были изучены наличие и степень выраженности диспластических и метапластических изменений вокруг опухоли у больных с ВЭБ-положительными и ВЭБ-негативными карциномами желудка. Наличие ВЭБ-инфекции в СОЖ было подтверждено двумя методами: методом гибридизации *in situ* (детекция вирусной РНК) и использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) (наличие фрагмента вирусной ДНК). Было показано, что только 13% ВЭБ-положительных карцином находились в окружении КМ, по сравнению с 41% ВЭБ-негативных раков желудка кишечного типа. [59, 75]. Рядом авторов показано, что ВЭБ-положительные карциномы чаще локализовались в верхней трети желудка, ВЭБ-негативные опухоли носили диффузный характер или относились к смешанному типу, причем разница была статистически достоверна [77].

В исследовании Cheng T.C. (2010) были смоделированы EBNA-1 экспрессирующие и EBNA-1-неэкспрессирующие клеточные линии рака желудка. Было найдено, что EBNA-1-экспрессирующие линии отличаются сниженной продукцией белка p53, что, по-видимому, связано с активацией его протеасомной деградации. Эти данные подтверждают ранее сделанное

предположение, что экспрессия ядерного протеина EBNA-1 в клетках рака желудка обеспечивает таким карциномам определенные преимущества в способности к росту, выживаемости, снижает чувствительность клеток к апоптотическим сигналам [57].

Murphy G. Et al. (2009) в своем мета-аналитическом исследовании показали, что ВЭБ-позитивные карциномы желудка (8,8%) встречались преимущественно у мужчин, локализовались преимущественно в кардиальном отделе или теле желудка. ВЭБ-позитивные опухоли примерно с равной частотой встречались среди выходцев из Азии, Европы и Америки [84]. В то же время в другом мета-аналитическом исследовании была выявлена определенная этническая ассоциация ВЭБ (превалирование опухолей у европейцев по сравнению с азиатами). ВЭБ-позитивные опухоли четко ассоциировались с таким редким типом опухолей как лимфоэпителиальная карцинома. В этих опухолях не было выявлено ассоциации с HP или мутациями p53, глубиной инвазии, наличием позитивных лимфатических узлов или клинической стадией [59].

В исследовании Truong C.D. et al. (2009) из 235 случаев РЖ в США ВЭБ-инфекция была детектирована только у 12 больных. РНК ВЭБ не определялись в нормальной СОЖ, клетках стромы РЖ или в диспластических и метапластических очагах, окружающих область карциномы. Было показано, что метастатические очаги в региональных лимфоузлах от больных с ВЭБ-позитивными опухолями также часто были ВЭБ-позитивными. Авторы выявили, что ВЭБ-позитивные опухоли преимущественно развились у мужчин, средний возраст которых был на 4 года меньше, чем у больных с ВЭБ-негативными опухолями [56, 82, 84, 90].

Особо хочется остановиться на американском исследовании J.L. Ryan et al. (2009), в котором анализировались аденокарциномы желудка с высоким уровнем вирусной ДНК в опухолевых клетках. Авторы скринировали 113 аденокарцином из низкорисковых (США) и высокорисковых (Центральная Америка) по раку желудка регионов на присутствие генетического материала ВЭБ. При этом было

произведено 6 определений методом ПЦР в реальном времени, нацеленных на идентификацию 6 различных регионов вирусного генома (BamH1W, EBNA1, LMP1, LMP2, BZLF1, EBER1). Параллельно производилось иммуногистохимическое окрашивание на LMP1, LMP2, литические протеины BZLF1 и BMRF1 и определение EBER1 методом гибридизации *in situ*. Такой комплексный подход к определению ВЭБ-положительных и ВЭБ-негативных опухолей, по мнению авторов, необходим вследствие низкой чувствительности применяемых отдельно методов и возможной потери части вирусного генома вследствие длительной персистенции вируса [71, 72, 80].

Примерно у 64% больных из США опухоли имели детектируемый уровень вирусной ДНК хотя бы в одном тесте из 6 ПЦР определений, а 11% опухолей были позитивны во всех 6 тестах. Среди опухолей из Центральной Америки все 100% опухолей несли ДНК ВЭБ. Вирусная РНК EBER определялась в 17% и 8% опухолей, соответственно. Оценка EBERs хорошо коррелировала с данными экспрессии фрагментов вирусной ДНК и вирусной нагрузкой. Вирусная нагрузка в EBER-положительных опухолях была значительно выше по сравнению с EBER-негативными. Вирусная нагрузка в 2000 копий на 100000 клеток рекомендована авторами в качестве своеобразного порога для разделения EBER-положительных и EBER-негативных опухолей. Среди EBER-негативных карцином в 29 случаях отмечались видимые EBER-положительные лимфоциты при гибридизации *in situ*. Причем вирусная нагрузка в таких опухолях была выше, по сравнению с теми тканями, где такие лимфоциты не выявлялись. Авторы также отмечают, что EBER-положительные карциномы локализовались преимущественно в проксимальном отделе желудка и относились к диффузному типу ($p < 0,05$). Анализируя результаты определения генома ВЭБ методом ПЦР в реальном времени и результаты иммуногистохимического окрашивания, авторы делают заключение, что в карциномах желудка ВЭБ вызывает патологический процесс, протекающий по типу латентной инфекции. При этом было выявлено 3 профиля инфекции: наиболее часто встречались EBER+/LMP-1-/LMP-2A- опухоли, реже EBER+/LMP-1-/LMP2A+ и EBER+/LMP-1+/LMP2A-. Авторы не предлагают

пересматривать стандарты ВЭБ-позитивности тканей и карцином, однако приводят доводы в пользу комплексной диагностики ВЭБ [65, 69, 71, 99].

Ряд авторов полагают, что хроническая ВЭБ-инфекция с наличием высоких титров IgG к ВКА ассоциирована с возникновением первично-множественных форм злокачественных новообразований, одним из которых является, в частности, диффузная В-клеточная лимфома, часто в ассоциации с раком желудка [87]. В связи с нарастающей распространенностью синдрома приобретенного иммунодефицита появились публикации, где обсуждается роль ВЭБ-инфекции в возникновении и прогрессии СПИД-ассоциированных гастроинтестинальных лимфом [63]. По последним данным литературы важнейшее этиопатогенетическое значение в патогенезе гастроинтестинальных лимфом также имеют НР и ВЭБ [49, 68, 69].

Комплексное изучение ВЭБ-статуса желудочных карцином, состава клеточного инфильтрата, гистологических особенностей и исследование микросателлитных нестабильностей выполнены К. Grogg с соавт. [81]. В работе показано, что ВЭБ-позитивные раки имели большее количество опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, по сравнению с ВЭБ-негативными, авторы их иначе называют “богатые лимфоцитами карциномы”. Для них характерна высокая частота микросателлитных нестабильностей.

Заключение по обзору литературы

Таким образом, значительная часть аспектов взаимосвязи ВЭБ с изменениями СОЖ до сих пор не решены. Несмотря на то, что большинство исследований свидетельствуют о низкой частоте ВЭБ-позитивных раков и о том, что в диспластической и метапластических очагах СОЖ ВЭБ не детектируется, появившиеся данные о наличии ВЭБ в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах в части EBV-негативных опухолей желудка, а также в инфильтрирующих СОЖ лимфоцитах у больных с тяжелым хроническим гастритом и высокими титрами

анти-ВЭБ антителами, заставляют считать перспективными дальнейшие исследования по изучению взаимосвязи латентной ВЭБ-инфекции в СОЖ при дисплазиях и раке желудка с особенностями клинического течения заболевания и составом клеточного инфильтрата.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены пациенты, поступившие на обследование в эндоскопическое отделение ФГБНУ НИИ онкологии для выявления заболеваний верхних отделов ЖКТ, и больные раком желудка, находившиеся на стационарном лечении в торако-абдоминальном отделении ФГБНУ НИИ онкологии. Из исследования были исключены больные с раком желудка в культе желудка.

2.1. Характеристика клинического материала

В исследование были включены 106 человек, которые в зависимости от характера изменений в СОЖ были разделены на 3 исследуемые группы. В I группу вошли больные с неопухолевыми изменениями СОЖ (атрофический или атрофически-гиперпластический гастрит в сочетании с дисплазией I степени) (n=36). У 16 больных были диагностированы предопухолевые изменения СОЖ с дисплазией эпителия II-III степени (II группа), что соответствовало эндоскопическим признакам пангастрита и хронического эрозивного гастрита. Третья группа состояла из 54 больных раком желудка I-IV стадии.

Обследованные лица из разных клинических групп были сопоставимы по возрасту (табл.1).

Таблица 1. Распределение больных по клиническим группам

Группа	Диагноз	Кол-во, n	Средний возраст, лет (M±m)
I	Больные с дисплазией эпителия СОЖ I степени	36	55,5±1,8
II	Больные с дисплазией эпителия СОЖ II-III степени	16	61,2±2,2
III	Больные раком желудка	54	59,5±1,9

В обеих клинических группах с предопухолевыми изменениями наиболее часто встречалась умеренная и выраженная активность воспаления (табл.2).

Таблица 2. Степень активности воспалительной реакции в СОЖ в зависимости от наличия и степени дисплазии

	Дисплазия I n=36	Дисплазия II-III n=16
Выраженная активность воспаления	16 (44%)	10 (63%)
Умеренная активность воспаления	15 (41%)	5 (31%)
Слабая активность воспаления	5 (15%)	1 (6%)

По гистологическому типу больные раком желудка распределились следующим образом: 48 больных имели аденокарциному желудка различной

степени дифференцировки, в том числе у 2 была выявлена высокодифференцированная аденокарцинома, у 20 - умереннодифференцированная и у 26 - низкодифференцированная. У 6 больных диагностирован перстневидно-клеточный рак.

Для определения макроскопического типа роста опухоли использовались критерии, приведенные в классификации Vogtmann (1926) [25]. Выделялись 4 формы роста опухоли: экзофитная, экзофитная изъязвленная, язвенно-инфильтративная и диффузно-инфильтративная (Vogtmann type I- IV). Распределение больных по гистологической структуре опухоли и форме роста представлены в таблице 3.

Таким образом, в общей структуре рака желудка доминировали умеренно- и низкодифференцированные аденокарциномы с язвенно-инфильтративной и инфильтративной формой роста.

Соотношение стадий у больных РЖ по классификациям ВОЗ и TNM представлено в таблице 4. Стадийность рака желудка представлена в соответствии рекомендациями ВОЗ [5]. Макроскопическая форма роста рака желудка в зависимости от локализации опухоли представлена в таблице 5.

Таблица 3. Гистологическая структура и степень дифференцировки опухоли желудка в зависимости от макроскопического типа роста опухоли

Форма роста опухоли/гистотип опухоли	Экзофитная	Экзофит-изъязвл.	Язвенно-инф. n=25	Инфильтративная n=13
Аденокарцинома, G1, n=2	-	-	2 (100%)	-
Аденокарцинома, G2, n=20	2 (10%)	4 (20%)	9 (45%)	5 (25%)
Аденокарцинома, G3, n=26	4 (15%)	6 (23%)	11 (42%)	5 (20%)
Перстневидно-клеточный рак n=6	-	-	3 (50%)	3 (50%)

Таблица 4. Распределение больных раком желудка в соответствии с классификациями ВОЗ (2010г) и TNM (Классификация злокачественных опухолей, шестое издание, 2003г)

Стадия по ВОЗ	I n=3	II n=6	III n=31	IV n=14
Стадия по TNM, n = 54	T1N0M0 - 3	T2N0M0 - 4 T2N1M0 - 2	T3N0M0-11 T3N1M0-10 T3N2M0-10	T4N1M0-4 T4N2M0-3 T4N3M0 -7

Таблица 5. Макроскопическая форма роста рака желудка в зависимости от локализации опухоли.

Локализация/рост о-ли n=54	Экзофитная n=6	Экзофитная изъязвленная n=11	Язвенно-инф. n=25	Инфильтративная n=12
Тело желудка n=22	2 (33,3%)	3 (27%)	11 (44%)	6 (50%)
Антральный отдел n=19	2 (33,3%)	6 (54,5%)	8 (32%)	3 (25%)
Кардиальный отдел n=13	2 (33,3%)	2 (18,5%)	6 (24%)	3 (25%)

Таким образом, в структуре рака желудка доминировало поражение тела и антрального отдела желудка с преимущественно язвенно-инфильтративной и инфильтративной формой роста.

2.2. Инструментальные методы исследования желудка

Эндоскопическое обследование проводили с помощью видеостойки фирмы «Olympus» Exera II. Перед началом процедуры производили анестезию корня языка спреем – анестетиком или полосканием раствором анестетика. Это расслабляло мышцы глотки уменьшало интенсивность рвотного рефлекса, что позволяло легко провести эндоскоп в пищевод. Гастроскопия выполнялась в положении на левом боку. В рот устанавливали специальный загубник для того, чтобы защитить эндоскоп от травмирования зубами. После этого дистальный конец эндоскопа обрабатывали специальным гелем и вводили в рот, мягко нажимая на язык при последовательном продвижении. Эндоскоп постепенно продвигали по просвету пищеварительного тракта, чтобы оценить состояние слизистой пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки. При заборе материала для исследования использовались биопсийные щипцы, которые вводились через биопсийный канал. После этого жидкость и воздух удаляется с помощью отсоса.

Во время исследования проводился забор биопсии из патологических участков и перифокально, из условно здоровой ткани. Всего бралось от 4 до 6 фрагментов СОЖ [42]. Для оценки наличия ВЭБ в СОЖ и вирусной нагрузки биоптаты помещались в транспортировочную среду и доставлялись в лабораторию онковирусологии. Для морфологических методов исследования биоптаты помещались в раствор формалина.

2.3. Морфологические методы исследования

Биоптаты слизистой оболочки обрабатывали по стандартной методике. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обрабатывали смесью 96% этилового спирта и 40% формалина (9:1) в течение 12 часов, затем обезвоживали в четырех порциях 96% спирта в течение 4 часов и помещали в смесь целлоидина и касторового масла на 1 сутки. После инкубации отмывали в трех порциях хлороформа по 30 минут и пропитывали смесью хлороформ-парафин в течение 6 часов. Далее заливали в парафин по стандартной методике. Из затвердевшего парафина вырезали скальпелем блоки. Полутонкие срезы (3-4 мкм) окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Окрашенные препараты изучались под микроскопом при увеличении объектив×90, окуляр×10, ×5, с помощью сетки Автандилова производили подсчет суммарной плотности воспалительного инфильтрата и отдельных клеточных элементов (лимфоцитов, плазмочитов, нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов) в 1 мм² собственной пластинки СОЖ.

2.4. Морфологический метод детекции *H. Pylori*

После иссечения биоптатов СОЖ их сразу же помещали в фиксирующий раствор, представляющий собой 10% раствор нейтрального формалина, являющийся стандартным тканевым фиксатором, позволяющим впоследствии использовать любые методики окраски гистологических срезов. Оптимальное время нахождения желудочных биоптатов в фиксирующем растворе – 6 часов. Стандартная процедура обезвоживания материала в спиртах возрастающей концентрации и заключения в парафин осуществлялась в условиях патогистологической лаборатории. Необходимо, чтобы толщина срезов не превышала 5 мкм.

Окраска препарата на *Hp* проводилась по Граму и включала:

- фиксацию препарата над пламенем

- обработку 0,1% раствором генцианвиолета (20 - 30 с)

водным раствором Люголя (2 мин)

— обесцвечивание в 2 сменах смеси спирта и ацетона (1: 1)

— докраску 0,1% водным раствором сафранина О (2 мин) [39].

Степень обсемененности СОЖ инфекцией *H. pylori* оценивалась методом световой микроскопии по критериям Аруина Л.И. с соавт. (1995), согласно которым выделяют три степени обсемененности слизистой оболочки:

слабая (+) – до 20 микробных тел в поле зрения (при увеличении 630);

средняя (++) – 20-50 микробных тел в поле зрения;

высокая (+++) – более 50 микробных тел в поле зрения [3].

2.5. Метод получения и анализа ДНК вируса Эпштейна-Барр из опухолевой ткани желудка

Использовался набор реагентов «АмплиСенс EBV-скрин-титр-FL», предназначенный для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Метод основан на выделении тотальной ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов, слюна, смывы и мазки из ротоглотки) с одновременной амплификацией (мультиплекс-ПЦР) в режиме «реального времени» участков ДНК LMP-гена ВЭБ и ДНК бета-глобинового гена, используемого в качестве эндогенного внутреннего контроля. Результат амплификации ДНК EBV регистрировали по каналу флуоресценции JOE/Yellow, результат амплификации внутреннего контроля регистрировали по каналу FAM/Green. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, являлась участком генома человека и всегда присутствовала в образце ДНК из клеток в

достаточном количестве, не менее 20 тыс геномов на пробу (ДНК из 10тыс клеток). Гибридизационно-флуоресцентную детекцию продуктов ПЦР-амплификации проводили с использованием амплификатора «Rotor-Gene» 6000. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, с последующим расчетом концентрации в исследуемых образцах относительно калибраторов.

Для количественного теста производился расчет концентрации в логорифмах копий ДНК ВЭБ на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) по формуле:

$$\begin{aligned} \lg \text{ копий ДНК ВЭБ на } 10^5 \text{ клеток} &= \\ = \lg \frac{\text{число копий ДНК ВЭБ в ПЦР-пробе}}{\text{число копий ДНК Glob в ПЦР-пробе}} &\quad \times 200000 \end{aligned} \quad (1)$$

Для выражения относительной концентрации ДНК ВЭБ в копиях на стандартное количество клеток (например, на 10^5) используется коэффициент пересчета 10^5 клеток= 2×10^5 геномов человека.

2.6. Определение специфических антител к антигенам литической инфекции вируса Эпштейн-Барр (IgG и IgA к вирусному капсидному антигену и IgG к комплексу ранних антигенов) в сыворотке крови больных с предопухолевой патологией и раком желудка

Для определения специфических антител к антигенам литической инфекции вируса Эпштейн-Барр (IgG и IgA к вирусному капсидному антигену и IgG к

комплексу ранних антигенов) проводился забор венозной крови больных по традиционной методике. Сыворотку крови получали в ходе центрифугирования. Методом непрямой иммунофлюоресценции (Henle W., Henle G., 1979) в сыворотке крови обследуемых лиц определяли концентрацию специфических антител к антигенам ВЭБ (IgG и IgA к ВКА, IgG к комплексу РА).

В качестве тест-системы использовали фиксированные препараты суспензионной вируспродуцирующей клеточной линии РЗН1. Учет реакции проводили под люминесцентным микроскопом NEOVAR-2F (Reichert-Jung, Австрия). Титром антител считали конечное разведение сыворотки, при котором обнаруживалось специфическое свечение клеток.

Диагностически значимым титром антител IgG к ВКА считали титр более или равный 1:320, IgA к ВКА – более или равный 1:10, IgG к комплексу РА – более или равный 1:10. Для диспластических процессов СОЖ диагностически значимым титром антител IgG к ВКА считали титр более или равный 1:160, IgA к ВКА – более или равный 1:10, IgG к комплексу РА – более или равный 1:10.

2.7. Статистические методы исследования

Ввиду отсутствия нормального распределения показателей, все результаты представлены в таблицах в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом. При статистической обработке полученных результатов использовали следующие методы:

- критерий Шапиро-Вилкокса для оценки нормальности распределения;
- критерий Манна-Уитни - для оценки значимости различий между группами при отсутствии нормальности распределения признака. Различия считались значимыми при $p < 0,05$;

- односторонний критерий Фишера или критерий Хи-квадрат – для оценки значимости различий между группами по качественным признакам. Различия считались значимыми при $p < 0,05$;

- прогностическая значимость признаков в отношении общей и безрецидивной выживаемости у больных раком желудка оценена с использованием программы Survival Analysis, STATISTICA 6.0. Кривые кумулятивной выживаемости строились по методу Каплана-Майера. Значимость различий в выживаемости между группами оценена по критерию Гехана-Вилкоксона [8, 9, 90, 37].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Частота встречаемости специфических иммуноглобулинов к ВЭБ в сыворотке крови у больных с диспластическими и метапластическими изменениями СОЖ

Для оценки роли ВЭБ в развитии метапластических и диспластических изменений в слизистой желудка была изучена частота встречаемости этих морфологических признаков в зависимости от титров иммуноглобулинов к ВЭБ. Была выявлена взаимосвязь встречаемости титра IgG к ВКА с выраженностью воспалительной реакции СОЖ. А именно, отсутствие или низкие титры антител чаще встречались у больных со слабой и умеренной выраженностью воспаления в СОЖ (табл. 6.). Высокие титры IgG к ВКА достоверно чаще встречались у больных с выраженной активностью воспаления в СОЖ (табл. 6). Какой-либо связи титра IgG к ВКА со степенью дисплазии и наличием КМ не выявлено. Также не выявлено связи встречаемости IgA к ВКА с наличием дисплазии, КМ, однако по мере увеличения концентрации этих антител возрастало число лиц с высокой активностью воспаления в СОЖ, на уровне тенденции ($p=0,07$, табл.7). Титр IgG к РА ВЭБ у пациентов с диспластическими изменениями в СОЖ не зависел от степени дисплазии, наличия КМ и выраженности воспаления (табл. 8).

Таблица 6. Частота встречаемости титра IgG к ВКА в сыворотке крови в зависимости от наличия КМ, степени дисплазии и выраженности воспаления в слизистой оболочке желудка у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка

Параметр	Титр Ig G к ВКА		P
	<1:160	≥1:160	
Наличие дисплазии:			
Д I, n=36	25 (69%)	11 (31%)	>0,05
Д II- III, n=16	10 (63%)	6 (37%)	
Наличие КМ:			
Нет КМ, n=30	20 (66%)	10 (34%)	>0,05
КМ, n=22	14 (64%)	8 (36%)	
Выраженность воспаления:			
Слабая и умеренная, n=25	21 (84%)	4 (16%)	<0,05
Выраженная, n=26	9 (35%)	17 (65%)	

Примечание: P<0,05 – достоверность различий в частоте встречаемости IgG к ВКА в сыворотке крови больных с диспластическими изменениями СОЖ с различной степенью воспаления в СОЖ.

Таблица 7. Частота встречаемости КМ, дисплазии различной степени, выраженности воспаления в зависимости от титра IgA к ВКА у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка

Параметр	Титр Ig G к ВКА		P
	Антитела не выявлены	$\geq 1:10$	
Наличие дисплазии:			
Д I, n=36	20 (56%)	16 (44%)	>0,05
Д II- III, n=16	9 (56%)	7 (44%)	
Наличие КМ:			
Нет КМ, n=30	19 (63%)	11 (37%)	>0,05
КМ, n=22	10 (45%)	12 (55%)	
Выраженность воспаления:			
Слабая и умеренная, n=25	16 (64%)	9 (36%)	>0,05
Выраженная, n=26	7 (23%)	19 (77%)	

Таблица 8. Частота встречаемости КМ, дисплазии различной степени, выраженности воспаления в зависимости от титра IgG к РА ВЭБ у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка

Параметр	Титр Ig G к РА		Р
	Антитела выявлены	не $\geq 1:10$	
Наличие дисплазии: Д I, n=36 Д II- III, n=16	20 (55,5%) 8 (50%)	16 (44,5%) 8 (50%)	>0,05
Наличие КМ: Нет КМ, n=30 КМ, n=22	19 (63%) 10 (45%)	11 (37%) 12 (55%)	>0,05
Выраженность воспаления: Слабая и умеренная, n=25 Выраженная, n=26	14 (56%) 13 (50%)	11 (44%) 13 (50%)	>0,05

3.2. Частота встречаемости специфических иммуноглобулинов к ВЭБ в сыворотке крови больных раком желудка

В связи с тем, что выраженность гуморальных реакций на ВЭБ слабо зависела от степени диспластических изменений в СОЖ, мы сочли возможным объединить группы больных с дисплазиями (ДІ – ДШ, n=52). Далее показатели гуморального иммунитета к ВЭБ, клеточный состав воспалительного инфильтрата СОЖ и инфицированность НР у больных раком желудка сравнивались с аналогичными показателями в общей группе больных с дисплазиями.

Встречаемость специфических иммуноглобулинов к ВЭБ у больных раком желудка в сравнительном аспекте с диспластическими изменениями в СОЖ представлена в таблицах 9-11.

Анализ противовирусных антител в сыворотке крови показал, что у больных раком желудка чаще встречались высокие титры IgG к ВКА (>1:320), чем у больных с диспластическими процессами в СОЖ (табл. 9, 11). Частота встречаемости в сыворотке крови IgA к ВКА и IgG к РА у пациентов с раком и дисплазиями не различались (табл. 10-11).

Таблица 9. Частота встречаемости IgG к ВКА у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка.

Группы, n	Титр Ig G к ВКА		
	≤1:320	>1:320	P
Диспластические изменения СОЖ, n=52	52 (100%)	0 (0%)	<0,05
Рак желудка, n=54	43 (80%)	11 (20%)	

Примечание: P<0,05 – достоверность различий в частоте встречаемости IgG к ВКА в сыворотке крови между больными с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка.

Таблица 10. Частота встречаемости IgA к ВКА у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка

Группы, n	Титр Ig A к ВКА		
	Антител не выявлено	≥1:10	P
Диспластические изменения СОЖ, n=52	30 (58)	22 (42%)	>0,05
Рак желудка, n=54	31 (57%)	23 (43%)	

Таблица 11. Частота встречаемости IgG к РА у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка.

Группы, n	Титр Ig G к РА		
	Антител выявлено	не $\geq 1:10$	P
Диспластические изменения СОЖ, n= 52	30 (58%)	22 (42%)	>0,05
Рак желудка, n=54	25 (46%)	29 (54%)	

Нами была проанализирована встречаемость различных титров противовирусных иммуноглобулинов у больных раком желудка в зависимости от локализации, степени дифференцировки и формы роста опухоли. У больных с перстневидно-клеточным раком степень дифференцировки опухоли не определялась, поэтому анализировались только больные с гистотипом «аденокарцинома».

Проведенный анализ показал, что среди больных с аденокарциномой высокие титры IgG к ВКА ВЭБ ассоциировались с формой роста опухоли: при экзофитной и экзофитно-изъязвленной форме роста опухоли высокие титры антител достоверно чаще встречались по сравнению с группой больных с инфильтративной и инфильтративно-язвенной формой роста опухоли ($p < 0,05$). Титр IgG к ВКА ВЭБ не ассоциировался со степенью дифференцировки и локализацией опухоли, хотя имеется определенная тенденция в более частой встречаемости высокого титра у больных с локализацией опухоли в теле и кардиальном отделе желудка (табл. 12).

Выявлены статистически значимые различия во встречаемости IgA к ВКА ВЭБ у больных раком желудка с различной локализацией опухолевого процесса. Более

высокие титры антител чаще встречались при локализации опухоли в кардиальном отделе и теле желудка (табл.13). Встречаемость IgG к РА ВЭБ у больных раком желудка не зависела от степени дифференцировки, локализации и формы роста опухоли (табл.14).

Таблица 12. Частота встречаемости титров IgG к ВКА у больных раком желудка в зависимости от локализации, степени дифференцировки и формы роста опухоли.

Показатели, n	Титр IgG к ВКА ВЭБ		P
	<1:320	≥1:320	
Степень дифференцировки:			
G1/G2, n = 22	16 (73%)	6(27%)	
G3, n= 26	15(55,5%)	11(45,5%)	>0,05
Локализация:			
Антральный отдел, n=16	13 (81%)	3 (19%)	
Кардия и тело желудка, n=32	18(56%)	14 (44%)	>0,05
Форма роста о-ли:			
Экз./Экз.-изъявл., n = 32	31 (97%)	1 (3%)	
Инф./Инф.-язв., n= 18	11 (61%)	7 (39%)	<0,05

Примечание: P<0,05 – достоверность различий в частоте встречаемости IgG к ВКА в сыворотке крови больных раком желудка с различными формами роста опухоли.

Таблица 13. Частота встречаемости титров IgA к ВКА у больных раком желудка в зависимости от локализации, стадии дифференцировки и формы роста опухоли.

Показатели, n	Титр IgA к ВКА ВЭБ		
	Антитела не выявлены	$\geq 1:10$	P
Степень дифференцировки: G1/G2, n = 22 G3, n = 26	12 (55%) 17 (65%)	10 (45%) 9 (35%)	>0,05
Локализация: Антральный отдел, n=16 Кардия и тело желудка, n=32	14(87,5%) 15 (47%)	2(12,5%) 17(53%)	<0,05
Форма роста : Инфильтративная и язв.-инф. , n=32 Экзофитная и экз.-изъяз., n=18	20 (63%) 10(56%)	12(37%) 8 (44%)	>0,05

Примечание: P<0,05 – достоверность различий в частоте встречаемости IgA к ВКА в сыворотке крови больных раком желудка с различной локализацией опухолевого процесса.

Таблица 14. Частота встречаемости титров IgG к РА ВЭБ у больных раком желудка в зависимости от локализации, стадии дифференцировки и формы роста опухоли

Показатели, n	Титр IgG к РА ВЭБ		
	Антитела не выявлены	$\geq 1:10$	P
Степень дифференцировки: G1/G2, n = 22 G3, n= 26	7 (47%) 15(58%)	15 (53%) 11 (42%)	>0,05
Локализация: Антральный отдел, n=16 Кардия и тело желудка, n=32	7(44%) 15(47%)	9 (56%) 17 (53%)	>0,05
Форма роста : Инфильтративная и язв.-инф., n=32 Экзофитная и экз.-изъяз., n=18	14 (44%) 8(44%)	18(56%) 10(56%)	0>0,05

В зависимости от уровня вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах все больные раком желудка были распределены на 2 группы: слабая степень вирусной нагрузки (менее 3) и высокая степень нагрузки (≥ 3). Анализ показал, что в большинстве случаев в гастробиоптатах опухоли вирусной нагрузки не выявлено или она была слабо выраженной (n=48), а высокая нагрузка ВЭБ отмечена только у 6 обследованных пациентов.

Нами проанализированы показатели титров IgG к ВКА, IgA к ВКА и IgG к РА в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от степени вирусной нагрузки в гастробиоптатах (табл. 15, 16, 17). Оказалось, что имеется только тенденция к более частой встречаемости низких титров всех трех типов антител при незначимой вирусной нагрузке и более высокой встречаемости высоких титров антител при высокой вирусной нагрузке. По-видимому, это обусловлено, особенностями противовирусного иммунитета больных раком желудка, возможно – особенностями вирусной нагрузки ВЭБ и особенностями иммунитета в низко- и высокорисковых регионах по раку желудка (табл.15, 16, 17).

Таблица 15. Степень вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах при разных титрах IgG к ВКА у больных раком желудка

Вирусная нагрузка ДНК ВЭБ, IgEBV на 10^5 клеток	Титр IgG к ВКА		
	<1:320	$\geq 1:320$	P
<3, n=48	33 (69%)	15 (31%)	>0,05
≥ 3 , n=6	2 (33%)	4 (66%)	

Аналогичная картина отмечалась и в отношении IgA к ВКА, которые при низкой вирусной нагрузке не определялись у 52% больных, а при высокой вирусной нагрузке – только в 16,6%, соответственно, значимый титр этих антител определялся чаще у больных с высокой вирусной нагрузкой (табл.16).

Таблица 16. Степень вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах при разных титрах IgA к ВКА у больных раком желудка

Вирусная нагрузка ДНК ВЭБ, IgEBV на 10^5 клеток	Титр IgA к ВКА		
	Антитела не выявлены	$\geq 1:10$	P
<3, n=48	25 (52%)	23 (48%)	>0,05
≥ 3 , n=6	1 (17%)	5 (83%)	

Определение IgG к РА ВЭБ в сыворотке крови показало, что чаще они отсутствовали у больных с низкой вирусной нагрузкой, но у 48% таких пациентов антитела определялись, в том числе, в высоких титрах, $>1:10$ (табл.17). Примечательно, что высокая вирусная нагрузка в опухоли также сочеталась чаще и с высокими титрами этих иммуноглобулинов.

Таблица 17. Степень вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах при разных титрах IgG к РА у больных раком желудка

Вирусная нагрузка ДНК ВЭБ, IgEBV/10 ⁵	Титр IgG к РА		
	Антитела не выявлены	≥1:10	P
<3, n=48	24 (50%)	24 (50%)	>0,05
≥3, n=6	1 (17%)	5 (83%)	

Таким образом, при отсутствии или слабой вирусной нагрузке (менее 3), преобладали больные с низкой концентрацией IgG к ВКА и с отсутствием IgA к ВКА и IgG к РА в сыворотке крови. Однако у части этих больных встречались высокие титры всех классов антител, особенно IgA к ВКА и IgG к РА. По-видимому, необходимо проведение дополнительных исследований с целью выявления особенностей иммунной системы у этой категории больных. Увеличение числа вирусных копий ДНК в опухолевой ткани сопровождалось повышением числа больных с высокими титрами противовирусных антител.

3.3. Инфицированность слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* больных с диспластическими изменениями и раком желудка в зависимости от степени вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах и противовирусного гуморального иммунитета

Проведенный анализ гастробиоптатов показал, что у больных с диспластическими изменениями СОЖ хеликобактериоз определялся у 56% исследуемых. Среди НР-инфицированных значимо чаще встречались больные с высокими титрами IgG к ВКА (≥1:160) (табл.18). В то же время среди НР-

негативных пациентов в 96% случаев IgG к ВКА либо не определялся, либо выявлялся в низких титрах.

Таблица 18. Титр IgG к ВКА ВЭБ в сыворотке крови у больных с диспластическими изменениями СОЖ в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфекции в СОЖ	Титр IgG к ВКА		
	<1:160	≥1:160	P
Нр-позитивные, n=29 (56%)	11 (38%)	18 (62%)	<0,05
Нр-негативные, n=23 (44%)	24 (96%)	1 (4%)	

Примечание: P<0,05 – достоверность различий в частоте встречаемости IgG к ВКА в сыворотке крови больных с диспластическими изменениями СОЖ с различным НР-статусом.

У НР-позитивных больных с диспластическими изменениями СОЖ значимо чаще антитела IgA к ВКА встречались в высоком титре, а у НР-негативных в 82,6% случаев данные антитела не выявлены (табл. 19).

Таблица 19. Титр IgA к ВКА ВЭБ у больных с диспластическими изменениями СОЖ в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфекции в СОЖ	Титр IgA к ВКА			
	Антитела выявлены	не выявлены	$\geq 1:10$	P
Нр-положительные, n=29 (56%)	9 (31%)	20 (69%)		<0,05
Нр-негативные, n=23 (44%)	19 (82%)	4 (18%)		

Примечание: $P < 0,05$ – достоверность различий в частоте встречаемости IgA к ВКА в сыворотке крови больных с диспластическими изменениями СОЖ с различным НР-статусом.

IgG к РА ВЭБ у НР-положительных больных с диспластическими изменениями СОЖ также чаще определялся в высоких значимых титрах. У НР-негативных пациентов в 87% случаев данные антитела не выявлены (табл. 20).

Титр IgG к РА у больных с диспластическими изменениями СОЖ в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфекции в СОЖ	Титр IgG к РА		
	Антител не выявлено	$\geq 1:10$	P
Нр-положительные, n=29 (56%)	8 (28%)	21 (72%)	<0,05
Нр-негативные, n=23 (44%)	19 (87%)	3 (13%)	

Примечание: $P < 0,05$ – достоверность различий в частоте встречаемости IgG к РА в сыворотке крови больных с диспластическими изменениями СОЖ с различным НР-статусом.

Изучение показателей у больных раком желудка показало, что колонизация СОЖ хеликобактериями встречалась у них реже (34%), чем при диспластических изменениях, но титры определяемых Ig к ВЭБ были более высокие (более 1:640), табл. 21. В то же время для НР-положительных больных раком были характерны более низкие концентрации IgG к ВКА ВЭБ, чем у пациентов без носительства НР. У 52% НР-негативных больных раком желудка титр IgG к ВКА в крови принимал максимальные значения (1:640).

Таблица 21. Титр IgG к ВКА в сыворотке крови у больных раком желудка в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфекции в СОЖ	Титр IgG к ВКА		
	<1:320	≥1:320	P
Нр-позитивные, n= 16 (34%)	13 (81%)	3 (19%)	<0,05
Нр-негативные, n=31 (66%)	10(32%)	21(68%)	

Примечание: P<0,05 – достоверность различий в частоте встречаемости IgG к РА в сыворотке крови больных раком желудка с различным НР-статусом.

Анализ концентрации IgA к ВКА в сыворотке крови не выявил различий в группах с наличием или отсутствием НР-инфекции: антитела определялись примерно у половины больных из каждой группы (табл.22).

Таблица 22. Титр IgA к ВКА в сыворотке крови у больных раком желудка в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфекции в СОЖ	Титр IgA к ВКА		
	Антител не выявлено	≥1:10	P
Нр+, n= 16 (34%)	8(50%)	8(50%)	>0,05
Нр- , n=31 (66%)	18(58%)	13(26%)	

Отсутствие в сыворотке крови IgG к РА чаще встречалось среди НР-позитивных больных раком желудка (табл.23), но различия были

недостовверными. В опухолевой ткани без признаков Нр-инфекции в 61% случаев IgG к РА определялись, при этом в высокой концентрации ($>1:10$) – в 32% случаев.

Таблица 23. Титр IgG к РА в сыворотке крови у больных раком желудка в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфекции в СОЖ	Титр IgG к РА		
	Антител выявлено	не $\geq 1:10$	P
Нр-позитивные, n= 16 (34%)	9(56%)	7(44%)	>0,05
Нр-негативные, n=31 (66%)	12(39%)	19(61%)	

Таким образом, на представленной выборке больных раком желудка нами выявлена только связь встречаемости IgG к ВКА с отсутствием либо наличием НР-инфекции. Частота встречаемости титров других типов иммуноглобулинов к ВЭБ не зависела от НР-статуса больного.

Данные по встречаемости НР-инфекции у больных раком желудка с различной вирусной нагрузкой ВЭБ представлены на рисунке 1. Всего было проанализирован 21 случай НР-позитивного РЖ и 29 случаев НР-негативного рака желудка с различной вирусной нагрузкой. Проведенный анализ показал, что высокий уровень вирусной нагрузки не встречался в НР-позитивных раках, а выявлялся только в НР-негативных РЖ (у 5 больных из 29), что оказалось статистически значимым.

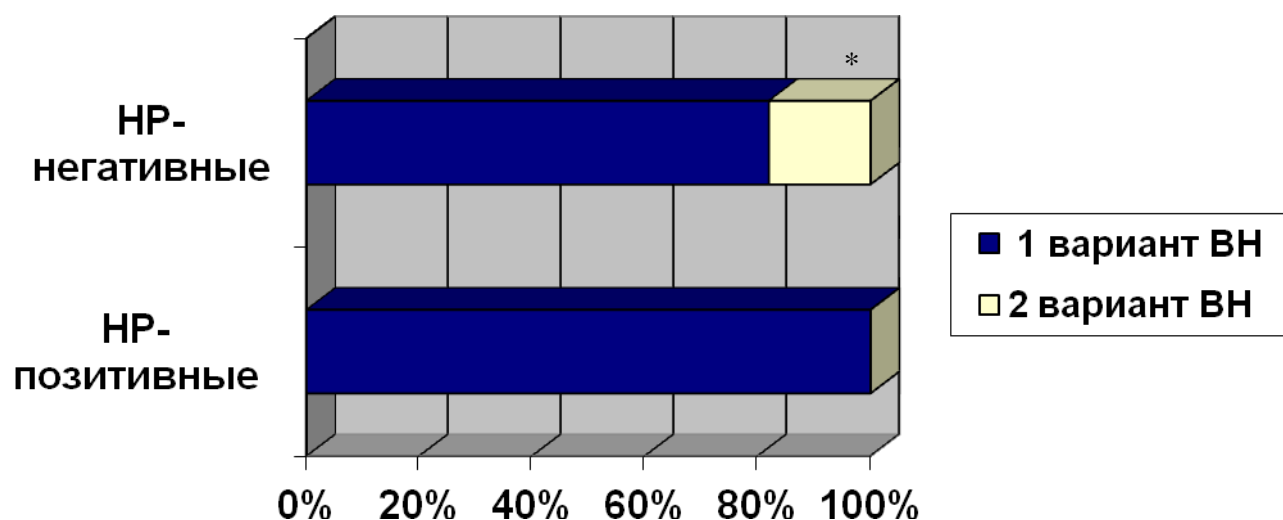


Рисунок 1 – Встречаемость НР-инфекции у больных раком желудка с различной вирусной нагрузкой (ВН) ВЭБ. Примечание - 1 вариант вирусной нагрузки (ВН) – 1g копий ДНК EBV на 10^5 клеток менее 3; 2 вариант ВН – 1g копий ДНК EBV на 10^5 клеток более 3. * - достоверность различий во встречаемости 2 варианта вирусной нагрузки по сравнению с НР-позитивными раками желудка.

3.4. Взаимосвязь *Helicobacter pylori*-инфекции с составом клеточного инфильтрата у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и раком желудка

Оценка состава клеточного инфильтрата в СОЖ у больных с диспластическими процессами выявила четкую зависимость от наличия НР-инфекции. При инфицировании СОЖ *Helicobacter pylori* возрастает общая клеточность инфильтрата, количество эозинофилов и плазмоцитов и падает количество нейтрофилов (табл.24). Причем сам характер инфильтрата остается лимфоплазмочитарным.

У больных раком желудка общая клеточность воспалительного инфильтрата вдвое превышала показатели общей клеточности больных с диспластическими процессами, однако какой-либо зависимости состава клеточного инфильтрата от наличия НР-инфекции не отмечено (табл. 25). Характер инфильтрата при раке желудка был преимущественно лимфоцитарно-нейтрофильно-макрофагальный, при этом абсолютное число этих клеточных элементов в опухолевой ткани превышало аналогичные значения при диспластических изменениях СОЖ.

Таблица 24. Клеточный состав воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка у больных с диспластическими изменениями при наличии или отсутствии *H. pylori*, в 1 мм², Me (Q₁-Q₃)

Группы/ показатели	Общее кол-во клеток	Лимфоциты	Эозинофилы	Плазмоциты	Нейтрофилы	Макрофаги
Нр- негативные, n=20	2245 (2167 - 2287)	1352 (1270- 1399)	113 (93,5- 137)	234 (199-255)	337 (240-373)	293 (261- 325)
Нр- позитивные n=25	2300 (2265- 2805)	1287 (1145- 1463)	151 (115- 355)	272 (241-527)	245 (118-255)	271 (91,0- 300)
P	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Примечание: P - уровень значимости различий между группами по критерию Манна-Уитни.

Таблица 25. Клеточный состав воспалительного инфильтрата у больных раком желудка с наличием или отсутствием *H. Pylori* в слизистой оболочке (в 1 мм²), Me (Q1-Q3)

Группы/ показатели	Общее кол-во клеток	Лимфоци- ты	Эозинофи лы	Плазмоци ты	Нейтро филы	Макрофаги
Нр- негатив ные, n=32	4365 (4221- 4533)	2345 (2172- 2498)	37,4 (28-48)	383,5 (313 -431)	860 (659- 995)	794 (683-893)
Нр- позитив ные, n=21	4440 (4162- 4684)	2273 (2058- 2441)	36,5 (28,0-44,0)	367 (310-449)	939 (711- 1080)	808 (747-885)
P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечание: P - уровень значимости различий между группами по критерию Манна-Уитни.

3.5. Состав воспалительного инфильтрата у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка в зависимости от показателей противовирусного гуморального иммунитета и вирусной нагрузки ВЭБ

Далее был проведен анализ состава клеточного инфильтрата в зависимости от уровня гуморального иммунитета к ВЭБ у больных с диспластическими изменениями СОЖ. Анализ полученных результатов показал, что у больных с диспластическими изменениями СОЖ при увеличении титра антител к IgG к ВКА происходят изменения клеточного состава инфильтрата: существенно уменьшается количество лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов и возрастает количество эозинофилов и плазмоцитов (рис.2).

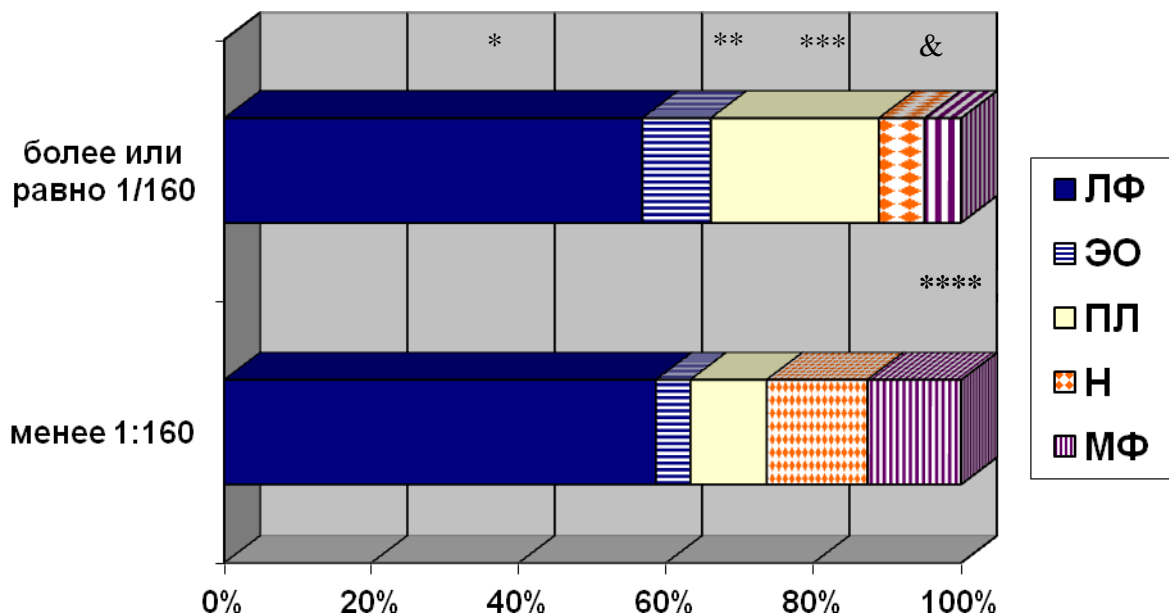


Рисунок 2 – Состав воспалительного инфильтрата СОЖ в зависимости от уровня IgG к ВКА. Примечание: ЛФ – лимфоциты, ЭО – эозинофилы, ПЛ – плазмоциты, Н – нейтрофилы, МФ – макрофаги; * - достоверность различий по сравнению с количеством лимфоцитов при титре IgG к ВКА менее 1:160, ** - достоверность различий по сравнению с количеством эозинофилов при титре IgG

к ВКА менее 1:160; *** - достоверность различий по сравнению с количеством плазмоцитов при титре IgG к ВКА менее 1:160; & -достоверность различий по сравнению с количеством нейтрофилов при титре IgG к ВКА менее 1:160; **** - достоверность различий по сравнению с количеством макрофагов при титре IgG к ВКА более или равном 1:160.

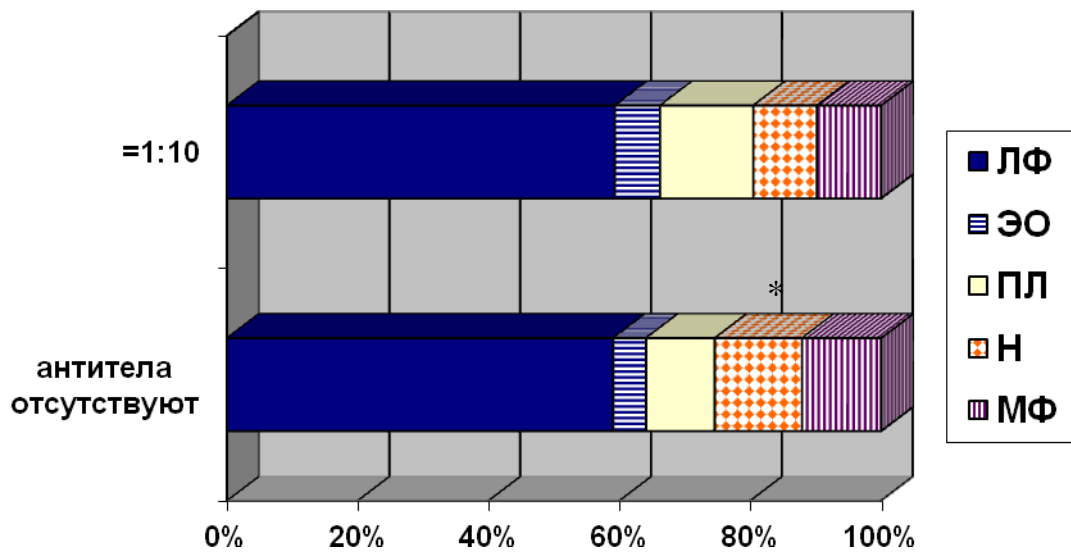


Рисунок 3 - Состав воспалительного инфильтрата СОЖ в зависимости от титра IgA к ВКА в сыворотке крови у больных с диспластическими процессами. Примечание: * - достоверность различия в количестве нейтрофилов при отсутствии IgA к ВКА, $p < 0,05$.

Анализ состава воспалительного инфильтрата в СОЖ при диспластических изменениях в зависимости от титра IgA к ВКА выявил увеличение доли нейтрофилов у больных, в сыворотке которых антитела не определялись (рис.3). Изучение воспалительного инфильтрата в СОЖ при диспластических изменениях

в зависимости от титра IgG к РА выявил увеличение показателя нейтрофилов при отсутствии антител (рис.4).

Таким образом, у больных с диспластическими изменениями СОЖ при увеличении титра антител к IgG к ВКА происходят изменения клеточного состава инфильтрата, выражающиеся в существенном снижении количества лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов и увеличении количества эозинофилов и плазмоцитов. При увеличении титра IgA к ВКА и IgG к РА ВЭБ в составе клеточного инфильтрата достоверно падает количество нейтрофилов.

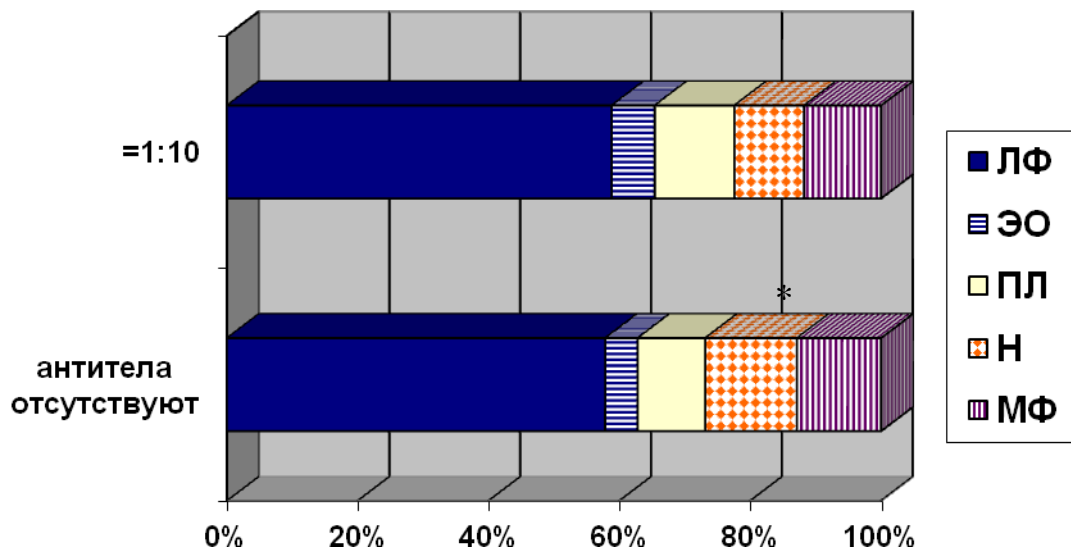


Рисунок 4 – Состав воспалительного инфильтрата СОЖ в зависимости от титра IgG к РА у больных с диспластическими процессами.

* - достоверность различий по сравнению с количеством нейтрофилов при отсутствии IgG к РА ВЭБ, $p < 0,05$.

Анализ состава клеточного инфильтрата в зависимости от уровня гуморального иммунитета к ВЭБ у больных раком желудка показал, что у

больных с низкими титрами IgG к ВКА число плазмоцитов в воспалительном инфильтрате было достоверно выше, чем у лиц с высоким содержанием IgG к ВКА ($\geq 1:320$). В то же время у больных раком желудка, имеющих титр IgG к ВКА $\geq 1:320$, количество эозинофилов было значительно выше по сравнению с больными с более высокими титрами IgG к ВКА (рис. 5).

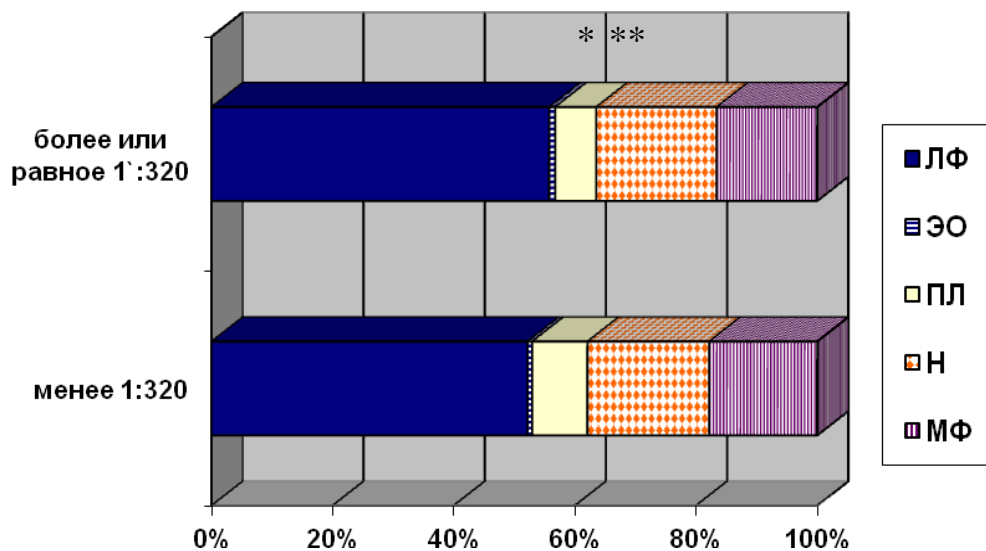


Рисунок 5 – Состав воспалительного инфильтрата СОЖ в зависимости от уровня IgG к ВКА у больных раком желудка. Примечание:

* - достоверность различий в количестве эозинофилов по сравнению с больными раком желудка, имеющими титр IgG к ВКА $< 1:320$, $p < 0,05$;

** - достоверность различий в количестве плазмоцитов по сравнению с больными раком желудка, имеющими титр IgG к ВКА $< 1:320$, $p < 0,05$.

Нами выявлено снижение количества плазмоцитов в клеточном инфильтрате опухоли больных раком желудка с высокими титрами IgA к ВКА, по сравнению с больными не имеющими антител этого класса антител (рис.6). Зависимости компонентов воспалительного инфильтрата СОЖ от уровня IgG к РА в сыворотке крови у больных раком желудка не выявлено.

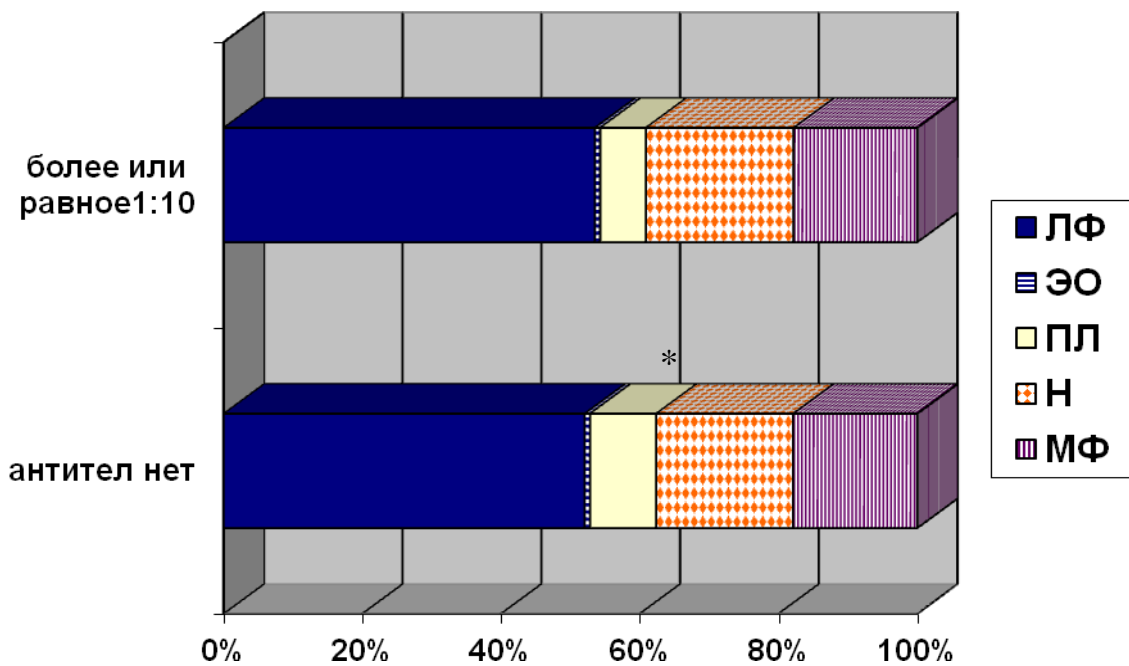


Рисунок 6 – Состав воспалительного инфильтрата СОЖ в зависимости от уровня IgA к ВКА у больных раком желудка. Примечание:

* - достоверность различий в количестве плазмоцитов по сравнению с больными раком желудка, имеющими титр IgA к ВКА $\geq 1:10$, $p < 0,05$.

Различия в составе воспалительного инфильтрата опухоли желудка касались количества нейтрофилов. У больных с высокой вирусной нагрузкой число нейтрофилов возрастало до 25% общей клеточности, в то время как у больных с незначимой вирусной нагрузкой или ее отсутствием (1 вариант вирусной нагрузки) их доля составила 19,7% (рис.7).

Анализ взаимосвязи вирусной нагрузки ВЭБ с составом клеточного инфильтрата у больных раком желудка показал, что общая клеточность не зависела от степени вирусной нагрузки. У больных с первым вариантом она составила 4421 (4157-4589) клеток на мм², со вторым вариантом - 4358 (4162-4681) клеток на мм².

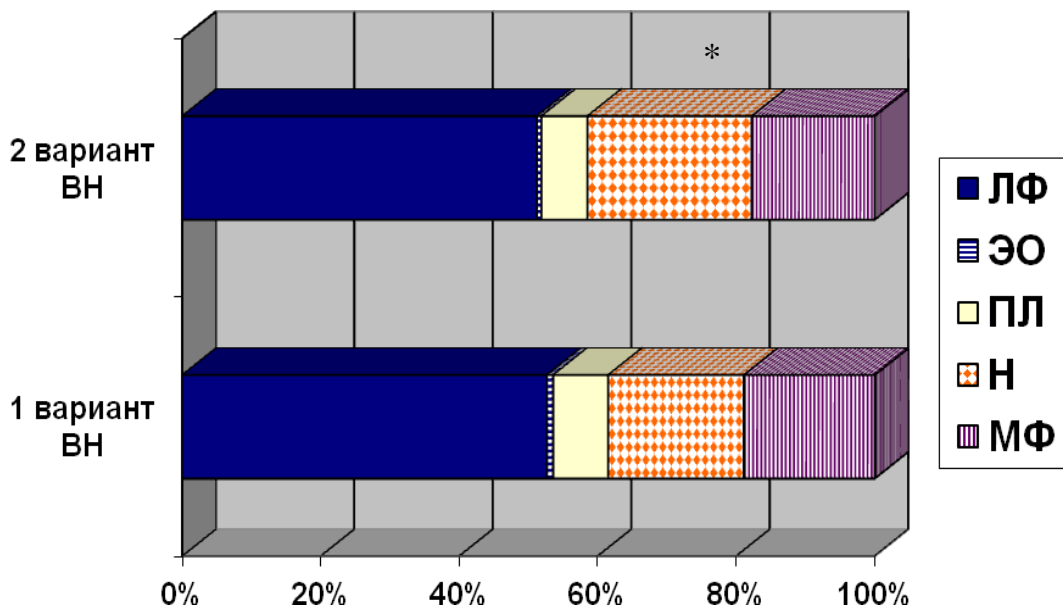


Рисунок 7 – Состав клеточного инфильтрата слизистой оболочки желудка у больных раком желудка с различной степенью вирусной нагрузки. Примечание: * - достоверность различий по сравнению с количеством нейтрофилов при 1 варианте вирусной нагрузки.

Таким образом, различия в составе воспалительного инфильтрата у больных раком желудка касались количества нейтрофилов, плазмоцитов и эозинофилов. У больных с высокой вирусной нагрузкой в опухолевой ткани возрастало число нейтрофилов, одновременно при высоких титрах IgG к ВКА снижалось число плазмоцитов и возрастало количество эозинофилов в СОЖ. Высокие титры IgA к ВКА сочетались со снижением количества плазмоцитов в клеточном инфильтрате опухоли. Зависимости состава воспалительного инфильтрата СОЖ от уровня IgG к РА в сыворотке крови у больных раком желудка не выявлено.

3.6. Прогностическая значимость состояния гуморального иммунитета к ВЭБ и уровня вирусной нагрузки, а также инфицированности *Helicobacter pylori* у больных раком желудка

В данном разделе работы была проанализирована прогностическая значимость показателей гуморального иммунитета к ВЭБ и уровня вирусной нагрузки, а также инфицированности СОЖ *Helicobacter pylori* у больных раком желудка III-IV стадии. Для оценки прогностической значимости инфицированности *Helicobacter pylori* и вирусом Эпштейна-Барр в появлении рецидивов заболевания и летальных исходов у больных раком желудка III-IV стадии был использован однофакторный анализ. Исследования показали, что титры противовирусных иммуноглобулинов (IgG к ВКА, IgA к ВКА, IgG к РА ВЭБ), вирусная нагрузка ВЭБ и наличие НР в СОЖ не являются прогностически значимыми в отношении безрецидивной выживаемости. В отношении общей выживаемости оказался статистически значимым уровень IgA к ВКА ВЭБ (рис. 5).

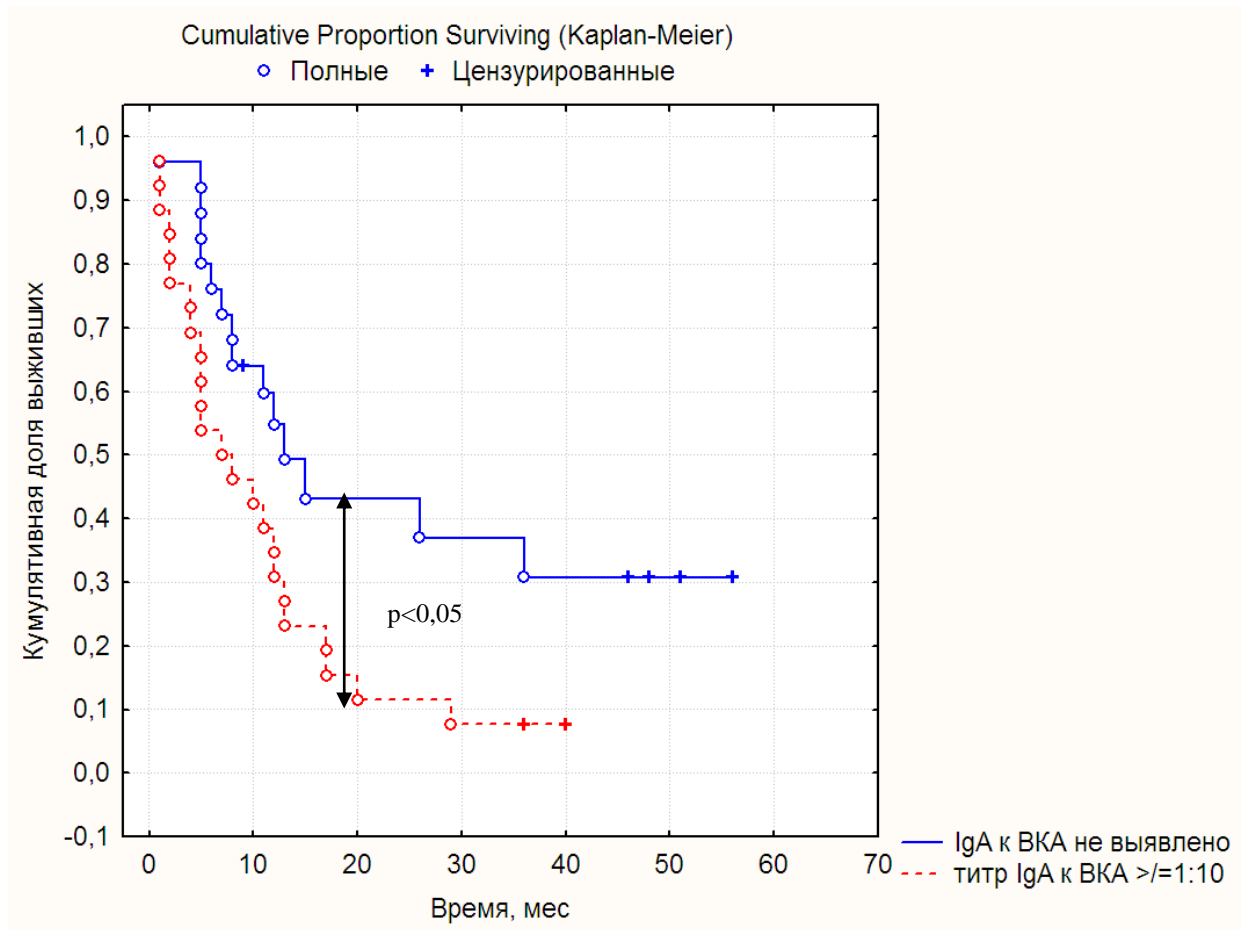


Рисунок 8 – Общая выживаемость больных РЖ с различными титрами IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови.

Примечание: сплошная линия – IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови не выявлялись, пунктирная линия – титр IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови $\geq 1:10$.

По оси абсцисс – время после оперативного этапа лечения (мес.), по оси ординат – кумулятивная выживаемость, рассчитанная по методу Каплан-Мейера.

Таким образом, больные РЖ III-IV стадии с отсутствием IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови имели лучшие показатели выживаемости по сравнению с больными с титрами IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови $\geq 1:10$. Двухлетняя общая выживаемость у больных с отсутствием IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови составила $43,2 \pm 1,7\%$, а у больных с титрами IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови

$\geq 1:10 - 12,1 \pm 1,5\%$. Трехлетняя общая выживаемость – соответственно $37,7 \pm 1,9\%$ и $8,7 \pm 0,9\%$.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рак желудка в структуре онкологической заболеваемости занимает ведущее место, как у мужчин, так и у женщин и имеет стабильно высокие показатели одногодичной летальности. Известно, что развитию рака желудка предшествуют нарушение роста и дифференцировки клеток и их злокачественное перерождение. Наряду с опасными для здоровья факторами окружающей среды (профессиональные, курение, алкоголизм, неправильное питание) в настоящее время важнейшим фактором риска, заслуживающим особого внимания, признано хроническое носительство потенциально онкогенных инфекционных агентов, в частности, *Helicobacter pylori* и вируса Эпштейна–Барр .

Актуальность изучения роли вирусов и хронической хеликобактерной инфекции в канцерогенезе опухолей эпителиального происхождения не вызывает сомнений. Оба инфекционных агента вызывают хроническое воспаление, персистируют в организме пожизненно, что объясняется их способностью взаимодействовать с иммунной системой, адаптироваться к ее изменениям, а для НР - и модифицировать состав надэпителиального слизистого слоя СОЖ, в котором они преимущественно и локализуются [16]. Однако механизмы вовлеченности НР и ВЭБ в процесс гастроканцерогенеза изучены недостаточно и, возможно, обусловлены их влиянием на состав воспалительного инфильтрата, количество и пролиферативную активность лимфоцитов, уровень продукции отдельных цитокинов НР-индуцированными эпителиоцитами, макрофагами и другими клетками. В настоящее время четко не сформулированы пороговые значения при определении вирусной нагрузки и критерии вирус-позитивности ВЭБ.

В связи с этим была сформулирована цель исследования: изучить роль инфекционной составляющей и воспалительного клеточного инфильтрата при диспластических изменениях СОЖ и раке желудка. В свете сказанного, мы полагали корректной попытку решения нескольких задач: изучить частоту встречаемости специфических иммуноглобулинов к ВЭБ в сыворотке крови и зависимость морфологических изменений от их титра у больных с

диспластическими изменениями слизистой оболочки и раком желудка, а также оценить особенности гуморального иммунитета к ВЭБ при инфицировании СОЖ *Helicobacter pylori* у данных групп пациентов с оценкой прогностической значимости показателей инфекционной составляющей у больных раком желудка.

Полученные собственные результаты, на наш взгляд, свидетельствуют о несомненной перспективности дальнейших исследований в этом направлении. В целях изучения роли ВЭБ в развитии метапластических и диспластических изменений в слизистой желудка нами была изучена частота встречаемости этих морфологических признаков в зависимости от титров иммуноглобулинов к ВЭБ путем определения у больных с предопухоловой патологией и раком желудка специфических антител к антигенам литической инфекции вируса Эпштейн-Барр (IgG и IgA к вирусному капсидному антигену и IgG к комплексу ранних антигенов) в сыворотке крови.

Было показано, что значимо чаще высокие титры IgG к ВКА определялись у больных, в СОЖ которых дисплазия сочеталась с выраженной активностью воспаления в СОЖ (табл.6). В связи с тем, что Нр-инфицированность также сопровождалась высокими концентрациями этих иммуноглобулинов, можно предположить значительную роль этих микроорганизмов в формировании морфологических перестроек и возникающего при этом воспаления.

Для Нр-инфицированных лиц была характерна также более высокая встречаемость IgA к ВКА и IgG к РА в титре $\geq 1:10$. Учитывая частое сочетание высоких титров IgA к ВКА с выраженным воспалением в СОЖ (табл.7), можно предположить индуцирующую роль вируса Эпштейна-Барр в развитии воспаления, а также его последствий. При этом при дисплазиях отмечается однонаправленность реактивных изменений в СОЖ на инфицирование ВЭБ и *H.pylori*. Доказательством являются низкие титры специфических иммуноглобулинов к ВЭБ у Нр-негативных больных с диспластическими изменениями СОЖ (табл.18, 19, 20).

Так как полученные результаты выявили взаимосвязь высокой активности гуморального иммунитета к ВЭБ с выраженностью воспаления в СОЖ, был также проведен анализ состава клеточного инфильтрата в зависимости от уровня гуморального иммунитета к ВЭБ. Показано, что при увеличении титра IgG к ВКА у больных с диспластическими изменениями СОЖ происходят значительные изменения клеточного состава инфильтрата: уменьшается количество лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов и возрастает количество эозинофилов и плазмоцитов. Примечательно, что при инфицировании *H.pylori* было отмечено также увеличение плотности эозинофилов и плазмоцитов, значимо повышающих общую клеточность воспалительного инфильтрата.

Известно, что эозинофилы и плазмоциты относятся к основным эффекторным клеткам, реализующим защитные реакции в слизистых оболочках. В то же время, по данным Piazuelo M. (2008), плотность эозинофилов в СОЖ была гораздо выше у субъектов с высоким риском рака желудка, по сравнению с пациентами с низким риском. При наличии КМ или дисплазии плотность эозинофилов прогрессивно возрастала, но только у больных с высоким риском малигнизации [64]. Анализ содержания эозинофилов в СОЖ при использовании дифференциальной окраски, выполненный в работе Каракешишевой М.Б. (2008) показал, что при дисплазии СОЖ отмечалось резкое увеличение по сравнению с контролем количества эозинофилов с преобладанием высокогранулированных форм, что может свидетельствовать о высокой активности эозинофилов у этих больных [16]. Десятилетний мониторинг пациентов с язвенной болезнью желудка привел к выводу, что при многолетних персистирующих язвах наблюдаются два стабильных признака: *H. pylori*-инфекция и повышенная эозинофильная инфильтрация, либо сочетание этих факторов [30]. В инфильтрате СОЖ также находили плазматические клетки, продуцирующие IgA и IgG. Увеличение плазмоцитов в инфильтрате СОЖ характерно для *Helicobacter pylori*-ассоциированного гастрита [62].

Результаты наших исследований также показали, что увеличение доли плазмоцитов в инфильтрате характерно и при высоком уровне гуморального

иммунитета к ВЭБ. Таким образом, у больных с диспластическими изменениями СОЖ характер воспалительного инфильтрата определяется, по-видимому, главными инфекционными агентами, детерминирующими развитие воспаления в СОЖ: *Helicobacter pylori* и ВЭБ.

Лимфоплазмочитарный характер воспалительного инфильтрата в сочетании с эозинофилией у пациентов с диспластическими изменениями в СОЖ может свидетельствовать в пользу возможного участия этих клеток в процессах канцерогенеза.

Наряду с этим, нами была отмечена сопряженность высоких титров противовирусных антител в сыворотке крови больных с дисплазиями со снижением числа нейтрофилов в составе клеточного инфильтрата. С нейтрофильными гранулоцитами связывают обострения воспалительного процесса, и их миграция в очаг тесно опосредована их микробицидными свойствами. В условиях Нр-инфицированности СОЖ это можно трактовать как нарушение защитных свойств слизистых покровов, возникающее, возможно, на фоне герпетической инфекции, что способствует персистирующему патогенному воздействию и структурным перестройкам.

Изучение противовирусного гуморального иммунитета у больных раком желудка показал, что у них значительно чаще встречались высокие титры IgG к ВКА (>1:320), чем у больных с диспластическими процессами в СОЖ (табл. 9, 11). Это соответствует данным литературы о высоком уровне специфических антител к ВЭБ у больных рядом злокачественных новообразований, в том числе больных раком гортани, глотки и носоглотки, околоносовых пазух, раком полости рта и языка, больных с лимфомами Беркитта, некоторыми формами гастроинтестинальных лимфом, раком щитовидной железы [10, 14, 49]. Ранее в работе Гончаровой Е.В. (2001) было показано, что высокая активность гуморального иммунитета к белкам ВЭБ в 70% случаев коррелировала с присутствием генетической информации ВЭБ в опухолевых клетках этих же больных, что, по-видимому, может свидетельствовать о принципиальной

возможности использования вирусспецифических антител в качестве диагностического маркера для выявления ВЭБ-положительных злокачественных опухолей желудка [10].

Анализ зависимости титра противовирусных иммуноглобулинов от локализации, степени дифференцировки и формы роста опухоли показал, что высокие титры IgG к ВКА чаще определялись при экзофитной и экзофитно-язвенной форме роста опухоли и значительно реже встречались при инфильтративной и инфильтративно-язвенной форме роста по классификации Vogtmann, $p < 0,05$. Известно, что классификация рака желудка по Vogtmann успешно применяется в онкологии, достаточно четко коррелирует с прогнозом [5, 18]. В настоящее время показано, что экспрессия некоторых молекулярных показателей (белки, микроРНК) ассоциировалась не только с клинической стадией, классификацией по Lauren, но и с классификацией по Vogtmann [83]. По-видимому, и в данном случае показатель, отражающий уровень специфического иммунитета к белкам ВЭБ, также связан с данной классификацией. Выявленная особенность, безусловно, требует дальнейшего более пристального изучения.

Также выявлено, что встречаемость IgA к ВКА ассоциировалась с локализацией опухоли. Высокие титры антител достоверно чаще встречались при новообразованиях кардиального отдела и тела желудка (у 53% больных) в то время как в антральном отделе это отмечено только у 12,5% больных (только у 2 больных) (табл. 13). Это может говорить в пользу невысокой значимости ВЭБ в развитии новообразований такой локализации. Действительно, для этой локализации характерно первичное заселение хеликобактерий, а развитие здесь воспалительных процессов может лежать в основе дисрегенераторных изменений СОЖ, регресса которых обычно не происходит [17, 22, 23, 33, 45, 17, 41, 95]. Полученные данные не противоречат ранее полученным на других популяциях больных РЖ результатам исследований Гончаровой Е.В. (2001), Kim P. et al. (2010), Murphy G. et al. (2009), Truong C. D. (2009), в которых также было показано, что ВЭБ-положительные карциномы, при которых обычно выявляются высокие титры специфических иммуноглобулинов к ВЭБ, действительно чаще

локализуются в кардиальном отделе и теле желудка и практически не встречаются в антральном отделе и чаще всего имеют умеренную, реже - низкую степень дифференцировки [10, 56, 77, 84].

У больных с кардиальными раками желудка, напротив, были выраженные гуморальные противовирусные реакции и определялись высокие титры IgG к РА (табл.14). Возможно, выявленные нами особенности противовирусного иммунитета у больных с кардиальными раками являются доказательством существенной роли ВЭБ в его формировании.

Для понимания взаимоотношения НР-инфекции и ВЭБ при развитии рака желудка нами была проведена оценка Нр-инфицированности опухолевой ткани. Полученные результаты позволяют говорить об антагонистическом характере взаимоотношений этих инфекционных агентов при раке желудка. На представленной выборке выявлена связь встречаемости высокого титра IgG к РА с отсутствием НР-инфекции и, напротив, высокой вирусной нагрузки в опухоли с негативными результатами теста на НР. Это может быть еще одним доказательством того, что развитие рака в разных отделах желудка происходит под действием различных инфекционных агентов.

В зависимости от уровня вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах все больные раком желудка были распределены на 2 группы: отсутствие или низкий уровень вирусной нагрузки (менее 3) и высокий уровень нагрузки (более 3). Анализ показал, что в большинстве случаев в гастробиоптатах опухоли отмечалось слабое вирусоносительство, а высокая нагрузка ВЭБ отмечена только у 6 обследованных пациентов. Нами были проанализированы показатели титров IgG к ВКА, IgA к ВКА и IgG к РА в сыворотке крови больных раком желудка в зависимости от степени вирусной нагрузки в гастробиоптатах (табл. 15, 16, 17).

Оказалось, что имеется только тенденция к более частой встречаемости низких титров всех трех типов антител при незначимой вирусной нагрузке и более высокой встречаемости высоких титров антител при высокой вирусной нагрузке. По-видимому, это обусловлено рядом причин, среди которых можно предположить особенности противовирусного иммунитета больных раком

желудка, возможно – особенностями вирусной нагрузки ВЭБ и особенностями иммунитета в низко- и высокорисковых регионах по раку желудка [47, 59, 65, 71].

Полученные результаты хорошо согласуются с исследованиями J.L. Ryan с соавт (2009), в котором показано, что примерно в 64% опухоли больных из различных регионов США (низкорисковые области по раку желудка) имели детектируемый уровень вирусной ДНК хотя бы в одном тесте из 6 ПЦР определений, а 11% опухолей были позитивны во всех 6 тестах. Среди опухолей из Центральной Америки (высокорисковые по раку желудка опухоли) все 100% опухолей несли ДНК ВЭБ. Вирусные РНК EBER-1 и EBER-2 определялись в 17% и 8% опухолей, соответственно, и именно оценка EBERs хорошо коррелировала с данными экспрессии фрагментов вирусной ДНК и вирусной нагрузкой. Вирусная нагрузка в EBER-позитивных опухолях была значительно выше по сравнению с EBER-негативными. Среди EBER-негативных карцином в 29 случаях отмечались видимые EBER-позитивные лимфоциты при гибридизации *in situ*. Причем вирусная нагрузка в таких опухолях была выше, по сравнению с теми тканями, где такие лимфоциты не выявлялись [71].

Для оценки связи воспалительного инфильтрата в опухолевой ткани с вирусным инфицированием нами был проведен анализ его состава в зависимости от уровня гуморального иммунитета к ВЭБ. Оказалось, что минимальный уровень эозинофилов в СОЖ был у больных с высокими титрами IgG к ВКА ($\geq 1:640$). Если учесть, что такая гуморальная реакция определялась при кардиальных раках с низкой дифференцировкой (G3) (табл.12), то это можно считать еще одним свидетельством в пользу вирусного, а не микробного (*H. pylori*) участия в канцерогенезе этой локализации. Эозинофилы, так же, как и тучные клетки, участвуют в иммунном ответе на *H. pylori*, но могут играть двойственную роль: в области с низким риском рака желудка повышенная плотность эозинофилов ассоциирована с преимущественно Th2-ответом и канцеропротективным эффектом; в области с высоким риском эозинофилы, наоборот, способствуют Th1-иммунному ответу в СОЖ, что ассоциировано с развитием предраковых изменений [52-54, 64].

Исследования показали, что максимальное число плазмоцитов в воспалительном инфильтрате было у больных с низкими титрами IgG к ВКА (титр IgG к ВКА менее 1:320). Известно, что плазмоцитарная инфильтрация характерна для Нр-инфицирования, и это еще раз подтверждает причастность хеликобактерий к антральным опухолям.

Выявлено снижение количества плазмоцитов в клеточном инфильтрате опухоли больных раком желудка с высокими титрами IgA к ВКА, по сравнению с больными, у которых антитела не определялись или содержались в низких концентрациях. В образовании иммуноглобулинов класса А участвуют эпителиоциты, и их уровень определяет в физиологических условиях степень защиты слизистых покровов. В тоже время это может отражать высокую степень инфицированности опухолевых клеток, продуцирующих компонент, а тканевая нейтропения и лимфопения являются проявлением сниженной реактивности.

Подсчет общей клеточности воспалительного инфильтрата у больных раком желудка с различными вариантами вирусной нагрузки не выявил достоверных различий. В тоже время выявлены различия в составе воспалительного инфильтрата опухоли: у больных с высокой вирусной нагрузкой возрастала доля нейтрофилов (до 25%), что может свидетельствовать об усиливающемся деструктивном процессе. При этом имеется тенденция к повышению доли лимфоцитов и снижению удельного веса других клеток воспалительного инфильтрата.

Результаты наших исследований совпадают с данными Caruso R.A. с соавт. (2009) [50]. В этом исследовании авторы отмечают, что действительно, в части опухолей желудка имеется массивная нейтрофильная инфильтрация, которая сопровождается повышенным уровнем ангиогенеза. Кроме того, полученные нами данные созвучны исследованию Grogg K. et al. (2003) и Lim H. et al. (2015), в работе которых было показано, что ВЭБ-позитивные злокачественные опухоли желудка имели большее количество опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов по сравнению с ВЭБ-негативными [68, 81]. Более высокая плотность лимфоцитов

является доказательством активации иммунной системы при ВЭБ - инфекции, в большей степени, ее гуморального звена.

Анализ прогностической значимости параметров, ассоциированных с инфекционными агентами, наиболее тесно вовлеченными в гастроканцерогенез, показал, что только уровень IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови обладает прогностической значимостью в оценке общей выживаемости. Больные раком желудка III-IV стадии с отсутствием IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови имели лучшие показатели двух- и трехлетней общей выживаемости, по сравнению с больными у которых IgA к ВКА ВЭБ определялся в титрах $\geq 1:10$.

Таким образом, несмотря на определенные достижения в выявлении механизмов гастроканцерогенеза проблема остается актуальной. Полученные данные об особенностях воспалительного инфильтрата у больных с диспластическими изменениями СОЖ и раком желудка в зависимости от инфицированности *Helicobacter pylori*, состояния гуморального иммунитета к ВЭБ и вирусной нагрузки могут являться основой для дальнейшего более детального изучения молекулярных механизмов вовлеченности ВЭБ в процесс гастроканцерогенеза и выявления специфических маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с целью исследования в данной работе проведен комплекс исследований по изучению частоты встречаемости специфических иммуноглобулинов к вирусу Эпштейна-Барр в сыворотке крови и зависимость морфологических изменений от их титра у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка, определению частоту встречаемости специфических иммуноглобулинов к вирусу Эпштейна-Барр у больных раком желудка во взаимосвязи с локализацией, степенью дифференцировки и формой роста опухоли. Также были выявлены особенности гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр при инфицировании слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* у больных с диспластическими изменениями и раком желудка и особенности воспалительного инфильтрата в СОЖ больных с диспластическими изменениями и раком желудка в зависимости от состояния гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр с оценкой прогностической значимости уровня вирусной нагрузки, гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр и инфицированности *Helicobacter pylori* у больных раком желудка.

Проведенный анализ позволил получить ряд важных данных о роли инфекционной составляющей в развитии диспластических изменений СОЖ и рака желудка. У больных с диспластическими изменениями СОЖ была выявлена взаимосвязь встречаемости титра IgG к ВКА с выраженностью воспалительной реакции СОЖ. Высокие титры IgG к ВКА достоверно чаще встречались у больных с высокой активностью воспаления в СОЖ. Какой-либо связи титра IgG к ВКА со степенью дисплазии и наличием КМ не выявлено. Также не выявлено связи встречаемости IgA к ВКА с наличием дисплазии, КМ, однако по мере увеличения концентрации этих антител возрастало число лиц с высокой активностью воспаления в СОЖ, на уровне тенденции ($p=0,07$, табл.7). Титр IgG к РА ВЭБ у пациентов с диспластическими изменениями в СОЖ не зависел от степени дисплазии, наличия КМ и выраженности воспаления.

У больных раком желудка чаще встречались высокие титры IgG к ВКА ($>1:320$), чем у больных с диспластическими процессами в СОЖ. Частота

встречаемости в сыворотке крови IgA к ВКА и IgG к РА и титр этих иммуноглобулинов у пациентов с раком и дисплазиями не различались.

У больных раком желудка высокие титры IgG к ВКА ВЭБ ассоциировались с формой роста опухоли: при экзофитной и экзофитно-язвенной форме роста опухоли высокие титры антител достоверно чаще встречались по сравнению с группой больных с инфильтративной и инфильтративно-язвенной формой роста опухоли ($p < 0,05$). Титр IgG к ВКА ВЭБ не ассоциировался со степенью дифференцировки и локализацией опухоли, хотя имеется определенная тенденция в более частой встречаемости высокого титра у больных с локализацией опухоли в теле и кардиальном отделе желудка. Более высокие титры IgA к ВКА ВЭБ чаще встречались при локализации опухоли в кардиальном отделе и теле желудка. Встречаемость IgG к РА ВЭБ у больных раком желудка не зависела от степени дифференцировки, локализации и формы роста опухоли

Имеется только тенденция к более частой встречаемости низких титров всех трех типов антител при незначимой вирусной нагрузке и более высокой встречаемости высоких титров антител при высокой вирусной нагрузке.

Изучение показателей у больных раком желудка показало, что колонизация СОЖ хеликобактериями встречалась у них реже (34%), чем при диспластических изменениях, но титры определяемых Ig к ВЭБ были более высокие. В то же время для НР-позитивных больных раком были характерны более низкие концентрации IgG к ВКА ВЭБ, чем у пациентов без носительства НР. У 52% НР-негативных больных раком желудка титр IgG к ВКА в крови принимал максимальные значения (1:640). Таким образом, на представленной выборке больных раком желудка нами выявлена только связь встречаемости IgG к ВКА с отсутствием либо наличием НР-инфекции. Частота встречаемости титров других типов иммуноглобулинов к ВЭБ не зависела от НР-статуса больного. Высокий уровень вирусной нагрузки не встречался в НР-позитивных раках, а выявлялся только в НР-негативных РЖ (у 5 больных из 29), $p < 0,05$.

Для больных с диспластическими изменениями СОЖ без НР-инфекции характерны низкие титры специфических иммуноглобулинов к ВЭБ. Для НР-

инфицированных лиц характерна высокая встречаемость IgG к ВКА в титре более 1:160, IgA к ВКА и IgG к РА в титре 1:10. По-видимому, в плане гастроканцерогенеза имеется определенная кооперация между ВЭБ и НР. У больных раком желудка взаимоотношения НР-инфекции и ВЭБ носят противоположный характер. На представленной выборке выявлена связь встречаемости высокого титра IgG к РА с отсутствием НР-инфекции и связь высокой вирусной нагрузки с негативными результатами теста на НР.

Оценка состава клеточного инфильтрата в СОЖ у больных с диспластическими процессами выявила четкую зависимость от наличия НР-инфекции. При инфицировании СОЖ *Helicobacter pylori* возрастает общая клеточность инфильтрата, количество эозинофилов и плазмоцитов и падает количество нейтрофилов. Причем сам характер инфильтрата остается лимфоплазмочитарным.

У больных раком желудка общая клеточность воспалительного инфильтрата вдвое превышала показатели общей клеточности больных с диспластическими процессами, однако какой-либо зависимости состава клеточного инфильтрата от наличия НР-инфекции не отмечено.

Анализируя данный фрагмент работы в целом необходимо отметить, что у больных с диспластическими изменениями СОЖ при увеличении титра антител к IgG к ВКА происходят изменения клеточного состава инфильтрата, выражающиеся в существенном снижении количества лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов и увеличении количества эозинофилов и плазмоцитов. При увеличении титра IgA к ВКА и IgG к РА ВЭБ в составе клеточного инфильтрата достоверно падает количество нейтрофилов. У больных раком желудка с высокой вирусной нагрузкой в опухолевой ткани возрастало число нейтрофилов, одновременно при высоких титрах IgG к ВКА снижалось число плазмоцитов и возрастало количество эозинофилов, что сопровождалось некоторым увеличением доли лимфоцитов в инфильтрате (увеличение количества опухолеинфильтрирующих лимфоцитов) по сравнению с больными с низкими титрами

специфических иммуноглобулинов к ВЭБ. Высокие титры IgA к ВКА сочетались со снижением количества плазмоцитов в клеточном инфильтрате опухоли. Зависимости состава воспалительного инфильтрата СОЖ от уровня IgG к РА в сыворотке крови у больных раком желудка не выявлено.

Наконец, анализ прогностической значимости параметров, ассоциированных с инфекционными агентами, наиболее тесно вовлеченными в гастроканцерогенез, показал, что уровень IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови в отношении общей выживаемости обладает прогностической значимостью. Больные раком желудка III-IV стадии с отсутствием IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови имели лучшие показатели двух- и трехлетней общей выживаемости по сравнению с больными с титрами IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови более или равные 1:10.

ВЫВОДЫ

1. Высокие титры IgG к ВКА достоверно чаще встречались у больных с высокой активностью воспаления в СОЖ (в 65%) по сравнению больными с низкой и умеренной степенью воспаления (16 %). Какой-либо связи титра IgG к ВКА и IgG к РА ВЭБ со степенью дисплазии, наличием кишечной метаплазии и активностью воспаления не выявлено.
2. У больных раком желудка высокие титры IgG к ВКА ВЭБ в сыворотке крови ассоциировались с формой экзофитной и экзофитно-изъязвленной формой роста опухоли. Более высокие титры IgA к ВКА ВЭБ чаще встречались при локализации опухоли в кардиальном отделе и теле желудка (в 53% случаев), по сравнению с антральным отделом (12,5%). Встречаемость IgG к РА ВЭБ у больных раком желудка не зависела от степени дифференцировки, локализации и формы роста опухоли.
3. У больных с диспластическими изменениями в СОЖ без НР-инфекции характерны низкие титры специфических иммуноглобулинов к ВЭБ, у НР-инфицированных лиц отмечается высокая встречаемость IgG к ВКА в титре более 1:160, IgA к ВКА и IgG к РА в титре $\geq 1:10$ ($p < 0,05$). У больных раком желудка выявлена связь встречаемости высокого титра IgG к ВКА $\geq 1:320$ и высокой вирусной нагрузки IgEBV на 10^5 клеток более 3 с отсутствием НР-инфекции.
4. У больных с диспластическими изменениями СОЖ высокий титр антител к IgG к ВКА (более или равный 1:160) сочетается со снижением количества лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов, и повышением количества эозинофилов и плазмоцитов в воспалительном инфильтрате, а высокие титры антител к IgA к ВКА и IgG к РА ВЭБ ($\geq 1:10$) - со снижением плотности нейтрофилов.
5. У больных раком желудка с высокой вирусной нагрузкой в опухолевой ткани возрастало число нейтрофилов, одновременно при высоких титрах IgG и IgA к ВКА снижалось число плазмоцитов и возрастало количество эозинофилов в инфильтрате. Зависимости состава воспалительного инфильтрата СОЖ от уровня IgG к РА в сыворотке крови у больных раком желудка не выявлено.

6. Больные РЖ III-IV стадии с отсутствием IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови имели лучшие показатели выживаемости по сравнению с больными с титрами IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови $\geq 1:10$. Двухлетняя общая выживаемость у больных с отсутствием IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови составила $43,2 \pm 1,7\%$, а у больных с титрами IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови $\geq 1:10$ – $12,1 \pm 1,5\%$, трехлетняя общая – $37,7 \pm 1,9\%$ и $8,7 \pm 0,9\%$, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови больных раком желудка является дополнительным молекулярным фактором прогноза выживаемости больных с III-IV стадией, что позволит оптимизировать тактику лечения данной категории больных.
2. Повышение уровня IgG к ВКА можно рассматривать как прогностический критерий прогрессирования предопухоловой патологии желудка.
3. Наличие высоких титров IgA к ВКА может использоваться как критерий формирования группы повышенного риска по раку желудка с локализацией в кардиальном отделе и теле желудка.

ЛИТЕРАТУРА

1. 2D-протеомика рака желудка: идентификация белков с повышенным синтезом в опухоли /Е. С. Григорьева, Ю.А. Букурова, Н.В. Чердынцева и др. // Сибирский онкологический журнал.-2009.-N5.-С.37-42.
2. Аруин Л. И. Из 100 инфицированных НР рак желудка возникает у двоих. Кто они? /Л.И. Аруин // Экспериментальная клиническая гастроэнтерология.- 2004.-№1.-С.12-18.
3. Аруин Л.И. Оценка обсемененности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* и активности хронического гастрита / Л.И. Аруин, В.А. Исаков // Арх. патологии.- 1995.-N3.-С.75-76.
4. Аруин Л. И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника /Л. И. Аруин, Л. Л. Капуллер, В. А. Исаков. – Москва: Триада-Х, 1998. – 483с.
5. Атлас TNM: иллюстрированное руководство по TNM/pTNM-классификации злокачественных опухолей: пер. с англ. 4-го издания / под ред. В.Е. Кратенок.- Минск: БелЦНМИ, 1998.-381с.
6. Баранская Е.К. Клинический спектр предраковой патологии желудка / Е.К. Баранская, В.Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. -2002.-3.-.7-14
7. Белоус Т.А. Начальный рак желудка / Т.А. Белоус //Росс. онкол. журн.- 2005.-N2.-С.19-22.
8. Боровиков В.П. Программа Statistica для студентов и инженеров: 2-е изд. / Боровиков В.П.-М.: Компьютер Пресс, 2001.-301с.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика /С. Гланц.- М.: Изд-во «Практика».-1999.-459с.
10. Гончарова Е.В. Вирус Эпштейн-барр и рак желудка: поиск и анализ вирусологических и молекулярно-биологических маркеров: автореф. дис....канд. мед. наук. – М., 2001, 24с.
11. Давыдов М.И. Результаты хирургии раннего рака желудка / М.И. Давыдов, И.Н. Туркин, Б.Е. Полоцкий //Вестник Московского онкологического общества.- 2008.-N9.-С.2-8.

12. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой.- М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России., 2012.- 260 с.
13. Инфицированность больных раком желудка *Helicobacter Pylori* в Оренбургской области по данным быстрого уреазного теста / М.А. Сеньчукова, Р.М. Тукманбетов, И.В. Бураков и др. // Вестник РОНЦ. Н.Н. Блохина РАМН.- 2009.-Т.20,№3.-С.68-73.
14. Исаева Т.М. Динамика антител к вирусу Эпштейн-Барр как дополнительный диагностический и прогностический критерий при опухолях головы и шеи : автореф. дис.канд. мед. наук. – Томск, 1990, 20с.
15. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе.-М.:Медицина, 2004.-576с.
16. Каракешешева М.Б. Морфо-функциональные особенности слизистой оболочки желудка и биохимический состав слизи при предраковых изменениях и раке желудка: автореф. дис.канд. мед. наук. – Томск, 2008, 22с.
17. Кашин С.В. Роль эндоскопического метода в диагностике предопухолевой патологии и рака желудка, ассоциированных с инфекцией *Helicobacter pylori*: автореф. дис.канд. мед. наук. – Ярославль, 2001, 26с.
18. Клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности интестинального и диффузного типов карцином желудка / И.В. Степанов, М.В. Завьялова, Е.С. Григорьева и др. // Сибирский онкологический журнал.- 2010.- №4.-С.55-66.
19. Коломиец Л.А. Эндогенные факторы риска рака желудка / Л.А. Коломиец: автореф. Дисс. докт. мед. наук.-Томск,1997.-35с.
20. Кононов А. В. Местный иммунитет и регенерация слизистых оболочек при хроническом воспалении: биопсийное исследование / А.В. Кононов. – Омск, 1993. – 320 с.
21. Кононов А. В. Иммунная система слизистых оболочек и *Helicobacter pylori* инфекция / А.В. Кононов // Сессия Российской группы по изучению *Helicobacter pylori*, 5-я. Материалы. – Омск, 1997. – С. 10.

22. Котелевец С.М. Морфофункциональные сопоставления при развитии кишечной метаплазии в слизистой оболочке желудка: С.М. Котелевец // РЖГГК.-2007.-N2.-С.80-83.
23. Маев И.В. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка в практике гастроэнтеролога: современный взгляд на проблему: И.В. Маев, О.В. Зайратьянц, Ю.А. Кучерявый // РЖГК.-2006.-N4.-С.38-48.
24. Маев И. В. Лимфоцитарный гастрит: особенности патогенеза, диагностики и лечения /И. В Маев// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2004. -№5.- С. 54 -57.
25. Марчук В.А. Закономерности местного распространения и регионального метастазирования рака желудка : автореф. дис.канд. мед. наук. – М., 2001, 23с.
26. Матвеевко О.А. Характеристика хромосомных нарушений в эпителиальных клетках при хроническом гастрите и раке желудка / автореф. Дис.канд. биол. наук. – Томск, 2013, 23с.
27. Мерабишвили В.М. Злокачественные новообразования в мире, России, Санкт-Петербурге / Мерабишвили В.М. -Спб., 2007.-424с.
28. Мерабишвили В.М. Рак желудка: эпидемиология, профилактика, оценка эффективности лечения на популяционном уровне / В.М. Мерабишвили // Практическая онкология.-2001.-N3.-С.3-8.
29. Местный иммунитет в ответ на инфекцию *Helicobacter pylori* / А.В. Кононов // *Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии. Под редакцией В.Т. Ивашкина, Ф. Мегро, Т.Л. Лапиной. – М.: «Триада-Х».-1999.-С.29-45.
30. Нуфтуллина Г. М. Паренхиматозно-стромальные взаимодействия в слизистой оболочке желудка у больных с длительно не заживающими язвами / Г.М. Нуфтуллина // Архив патологии.- 1999.-№ 6.-С. 7-10.
31. Павлович И.М. Атрофический гастрит (клиническая и функционально-морфологическая характеристика, критерии риска опухолевой трансформации / И. М. Павлович // РЖГК.-2008.-N1.-С.85-86.

32. Панкова О.В. Комплексная морфометрическая оценка дисплазии слизистой оболочки при предопухолевых заболеваниях и раке желудка / О.В. Панкова - Томск, 1997.-23с.
33. Пасечников В.Д. Предраковые изменения желудка и возможности эрадикационной терапии в профилактике *H.pylori*-ассоциированного рака желудка / В.Д. Пасечников, С.З. Чуков //РЖГГК.-2006.-№3.-С.52-57.
34. Пауков В. С. Патогенетические аспекты хронического воспаления / В.С. Пауков, Б. Б. Салтыков, Н. Г. Ермаков // Архив патологии – 1998.- №1.- С. 34-38.
35. Писарева Л.Ф. О необходимости учета фактора миграции населения при эпидемиологических исследованиях / Л.Ф. Писарева, А.П. Бояркина // Сибирский онкологический журнал.-2005.-№1.-С.47-52.
36. Писарева Л.Ф. Рак желудка в регионе Сибири и Дальнего Востока. Факторы риска. / Л.Ф. Писарева, Л. А. Коломиец.-Томск: СТТ, 2001- 276с.
37. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA /О.Ю. Реброва- М., Медиасфера, 2002.-312с.
38. Роль компонентов желудочной слизи и клеточного состава воспалительного инфильтрата слизистой оболочки в оценке риска развития рака желудка : М.Б. Каракешишева, Н.В. Бочкарева, В.А. Евтушенко и др.// Сибирский онкол. журн.-2007.-№4(24).-С.57-61.
39. Сальников А. В. Морфофункциональное состояние слизистой оболочки желудка и надэпителиального слизистого слоя при *Helicobacter pylori* инфекции / А.В. Сальников - Томск, 1999.-126с.
40. Серологический скрининг предопухолевой патологии и раннего рака желудка / И.В. Маев, Е.В. Мельникова, С.В. Кашин и др. // Клиническая медицина.-2008.-№11.-С.43-48.
41. Сиппонен П. Гастрит- атрофический гастрит – кишечная метаплазия – рак желудка: обратима ли эта последовательность? / П. Сиппонен, К. Сеппала // Росс. журн. гастр. и гепатологии.-1999.-№2.-С.30-34.

42. Современные эндоскопические методики диагностики и лечения предопухоловой патологии и раннего рака желудка / Б.К. Поддубный, Ю.П. Кувшинов, С.В. Кашин и др. // РЖГГК.-2002.- N3.-С.52-56.
43. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году / Под ред А.Д.Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой - М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России., 2013.- 232 с.
44. Характеристика воспалительного инфильтрата слизистой оболочки желудка у больных с дисплазией II-III степени и раком желудка: В.А. Евтушенко., М.В. Вусик, М.Б. Каракешешева и др.// Клиническая медицина.-2008, N11.-С.48-53.
45. Хомерики С. Г. Процессы регенерации в слизистой оболочке желудка и канцерогенез / С.Г. Хомерики // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. – №2. – С. 17-25.
46. Щепотин И. Рак желудка: практическое руководство по профилактике, диагностике и лечению / И. Щепотин, С.Р. Эванс.- Киев: Книга Плюс,2000.- 227с.
47. Asim M. Helicobacter pylori induces ERK-dependent formation of a phospho-C-FOS/C-JUN AP-1 complex that causes apoptosis in macrophages / M. Asim, R. Chaturvedi, S. Hoge //J. Biol. Chem.-2010.-Vol. 285.-P.20343-20357.
48. Association of Epstein-Barr virus antibody levels with precancerous lesions in a high-risk cohort / A.J. Schetter, W.C. You, E.T. Lennette et al. //Cancer Sci.-2008.-Vol.99(2).-P.350-354. ВЭБ
49. Bautista-Quach M.A. gastrointestinal lymphomas: morphology, immunophenotype and molecular features / M. A. Bautista-Quach, C.D. Ake, M. Chen // J. Gastrointest. Oncol.-2012.-Vol. 3(3).-P.209-225.
50. Caruso R.A. Granulomatous inflammatory reaction in human gastric adenocarcinomas: a light and electron microscopy study / R.A. Caruso, G. Basile, G. Pizzi // Ultrastruct. Pathol.-2009.-Vol. 33(6).-P. 269-273.
51. Caruso R.A. Ultrastructural observations on inflammatory angiogenesis in gastric carcinomas with massive neutrophil infiltration / R.A. Caruso, A. Bonanno, G. Finocchiaro // Ultrastruct. Pathol.-2009.-Vol. 33(1).-P.1-5.

52. Caruso R.A. Mast cell and eosinophil interaction in gastric carcinomas: ultrastructural observation / R.A. Caruso, F. Fedele, V. Zuccala // *Anticancer Res.*-2007.-Vol. 27(1A).-P.391-394.
53. Caruso R.A. Perivascular mast cells in advanced adenocarcinomas: an electron microscopic study / R.A. Caruso, A. Ieni, V. Fabiano // *Anticancer Res.*-2004.-Vol. 24(4).-P.2257-2263.
54. Caruso R.A. Degranulation patterns of eosinophils in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic study [текст] / R.A. Caruso, A. Ieni, F. Fedele // *Ultrastruct. Pathol.*-2005.-Vol.29(1).-P.29-36.
55. Chang M.S. Epstein-Barr virus-encoded BARTF1 promotes proliferation of gastric carcinoma cells through regulation of NF-kappa B [текст] / M. S. Chang, D.H. Kim, J.K. Roh // *J. Virol.* – 2013.-Vol. 87(19).- P. 10515-10523.
56. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U. S. A. / C.D. Truong, W.Feng, W. Li et al.//*J. Exp.Clin. Cancer Res.*-2009.-Vol.3.-P.14-19.
57. Cheng T.C. Expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in gastric carcinoma cells is associated with enhanced tumorigenicity and reduced cisplatin sensitivity / T.C. Cheng, S.S. Hsieh, W.L. Hsu // *Int. J. Oncol.*-2010.-Vol.36(1).-P.151-160.
58. Gleich G.J. Eosinophils and human disease / G.J. Gleich, E.A.Ottesen, K.M.Leiferman // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* –1989. – Vol.88(1– 2). – P.59– 62.
59. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: a meta-analysis / J.H. Lee, Kim S.H., Y.A. Han et al. // *J. Gastroenterol. Hepatol.*-2009.-Vol.24.-P.354-365.
60. Effect of interleikin-1 polymorphism's on gastriv mucosal interleikin- 1 β production in *Helicobacter pylori* infection / I. R. Hwang, T. Kodama , S. Kikushi et al. // *Gastroenterology.* – 2002.-Vol.123.-P. 1793-1803.
61. Endo S. Detection of *Helicobacter pylori* in early stage gastric cancer / S. Endo, T. Ohkusa, Y. Saito // *Cancer.* - 1995-Vol.75.-P. 2203-2208.

62. Elios M.M. VacA and HP-NAP, Ying and Yang of Helicobacter pylori-associated gastric inflammation / M.M. Elios, C. Montecucco, M. de Bernard //Clin. Chim. Acta.-2007.-Vol. 381(1).-P.32-38.
63. Endoscopic appearance of AIDS-related gastrointestinal lymphoma with c-MYC rearrangement: case reports and literature review / S. Tanaka, N. Nagata, Mine S. et al. // World J. Gastroenterol.-2013.-Vol. 19 (29).-P.4827-31.
64. Eosinophils and mast cells in chronic gastritis: possible implications in carcinogenesis / M.B. Piazuolo, M.C. Camargo, R.M. Mera et al. //Hum. Pathol.-2008.-Vol.39(9).-P.1360-1369.
65. Epstein-barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. Chen XZ, Chen H, Castro FA et al. //Medicine (Baltimore). -2015.- May;94(20):e792.
66. Epstein-Barr virus gastritis: an underrecognized form of severe gastritis simulating gastric lymphoma / Z.M. Chen, R. Shah R., Zuckerman G.R. et al. //Am. J. Pathol. – 2007.-Vol.31(9).-P.1446-1451.
67. Epstein Barr virus and Helicobacter pylori co-infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients / M.G. Cardenas-Mondragon, R. Carreon-Talevera R., Camorlinga-Ponce M. et al. // PLOS One.-2013.-Vol. 8(4).-e62850. doi: 10.1371/journal.pone.0062850.
68. Features of gastric carcinoma with lymphoid stroma associate with Epstein-Barr virus. / Lim H, Park YS, Lee JH et al. //Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2015. pii: S1542-3565(15)00417-6.
69. He X.X. Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric cancerogenesis / X.X. He, J. Yang, Y.W. Ding // Gut.-2006.-Vol.55.-P.797-802.
70. Helicobacter pylori and molecular markers as prognostic indicators for gastric cancer in Korea. /Kim HJ, Hwang SW et al. //J. Cancer Prev. – 2014.- Vol.19(1).-P.56-67.
71. High levels of Epstein-barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma / J.L. Ryan, D.R. Morgan, R.D. Dominguez et al. // Lab.Invest.-2009.-Vol.89(1).-P.80-90.

72. Hypermethylation of the interferon regulatory factor 5 promoter in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma / Dong SM, Lee HG, Cho SG et al. //J. Microbiol.-2015.- Vol.53(1).-P.70-76.
73. Interleukin-1 polymorphism associated with increased risk of gastric cancer / E. M. El-Omar, M. Carrington, W.H. Chow et al. //Nature.- 2000.-Vol.404.-P.398-402.
74. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases / Oh JK, Weiderpass E. et al. // Ann. Glob. Health.- 2014.-Vol.80(5).-P.384-392.
75. Kaizaki Y. Atrophic gastritis, Epstein-Barr virus infection, and Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma / Y. Kaizaki, S. Sakurai, J.M. Chong //Gastric Cancer.-1999.-Vol.2(2).-P.101-108.
76. Kato M. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissues: evidence for eosinophil degranulation in normal gastrointestinal tract /M. Kato, G.M. Kephart, A. Moricawa //Int. Arch. Allergy Immunol. – 2001. – Vol. 125. – Suppl. 1. – P.55– 58.
77. Kim B. Cell cycle regulators, APC/beta-catenin, NF-kappaB and Epstein-Barr virus in gastric carcinomas /B.Kim, S.J. Byun, Y.A. Kim //Pathology.-2010.-Vol.42(1).-P.58-65.
78. Li G.Q. Macrophage migration inhibitory factor regulates proliferation of gastric cancer cells via PI3K/Akt pathway / G.Q. Li, J.Xie, X.Y. Lei //World J. Gastroenterol.-2009.-Vol.15(44).-P.5541-5548.
79. Liu Y. L. Effects of mast cell infiltration on the development and metastasis of gastric carcinoma / Y.L. Liu, M.Q. Zhao, G. Hou // Di Yi Jun Da Xue Bao.-2005.-Vol. 25(7).-P.809-811.
80. Long-term survival of patient with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer treated with chemotherapy: case report /Yanai H, Yahara N, Furuya T. et al. //J. Gastrointest. Cancer.- 2015.- May 14.
81. Lymphocyte-rich gastric cancer: association with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival / K.L. Grogg, C.L. Lohse, V. Pankratz et al. // Modern Pathol. -2003. -Vol. 16(7). - P. 641-651.

82. Lymphoepithelioma-like carcinoma: a distinct type of gastric cancer / Park S., Choi M.G., Kim K.M. et al. // *J Surg Res.* -2015.-Vol.194(2).-P.458-63.
83. Ma X.Q. Relationship between the expression level of miR-29c and biological behavior of gastric cancer / Ma X.Q., Wang L.P., Luo Q.C. // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*-2015.-Vol. 35(5).-P.325-330.
84. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location / G.Murphy, R. Pfeiffer, M.C. Camargo et al. // *Gastroenterology.*-2009.-Vol.137(3).-P.824-833.
85. Mohri Y. Identification of macrophage migration inhibitory factor and human neutrophil peptides 1-2 as potential biomarkers for gastric cancer / Y.Mohri, T.Mohri, W.Weii // *Brit. J. Cancer.*-2009.-P.295-302.
86. Ohno S. The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients /S. Ohno, H. Inagawa, D.K. Dhar // *Anticancer Res.*-2003.-Vol.23(6D).-P.5015.-5022.
87. Oguma K. Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor –alpha in gastric tumor cells /K. Oguma, H. Oshima, M.Aoki // *EMBO J.*-2008.-Vol.27(12).-P.1671-1681.
88. Primary lung cancer complicated by malignant lymphoma in two cases of Epstein-barr virus infection / Z. Ohno, Tanaki H., Ohsuga T. et al. // *Case Rep.Oncol.*-2012.-Vol. 5(2).-P. 376-372.
89. Plasmablastic lymphoma of the stomach with C-MYC rearrangement in an immunocompetent young adult: a case report / Huang X, Zhang Y, Gao Z. et al. // *Medicine (Baltimore).* -2015.-Vol.94(4):e470.
90. Profiling of virus-encoded microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and their roles in gastric carcinogenesis / Shinozaki-Ushiku A, Kunita A. et al. // *J Virol.*- 2015.-Vol. 89(10).-P.5581-5591.
91. Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Group Francais d'Immunotarapie / S. Negrier, B. Escudier, F. Gomes et al. // *Annals of Oncology.*-2002.-Vol.13.-P. 1460-1468.

92. Shun C.T. Expression of macrophage migration inhibitory factors is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas /C.T. Shun , J.T. Lin, S.P. Huang // *World J. Gastroenterol.*-2005.-Vol.11(24).-P.3767-3771.
93. Serum macrophage migration-inhibitory factor as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer / H.H. Xia, Y.Yang, K.M. Chu et al. // *Cancer.*-Vol.155(23).-P.5441-5449.
94. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia / M.Haas,. Dimmler, W. Hohenberger et al. // *BMC Gastroenterol.*-2009.-Vol.4.-P.59-65.
95. Tari A. Basis of decreased risk of gastric cancer in severe atrophic gastritis with eradication of *Helicobacter pylori* / A. Tari, Y. Kitadai, M. Sumii // *Dig. Dis. Sci.*-2007.-Vol.52(1).-P.232-239.
96. The extent of inflammatory infiltration in primary cancer tissues is associated with lymphomagenesis in immunodeficient mice / Zhang L, Liu Y, Wang X et al. // *Sci. Rep.*- 2015.-Vol. 30.-P.9447.
97. Three molecular subtypes of gastric adenocarcinoma have distinct histochemical features reflecting Epstein-Barr virus infection status and neuroendocrine differentiation / Speck O, Tang W, Morgan D.R. et al. // *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*-2014.-Dec 16.
98. Tumor-associated macrophage infiltration in gastric cancer / S. Ishigami, S. Natsugoe, K. Tokuda et al. // *Anticancer Res.*-2003.-Vol 23(5A).-P.4078-4083.
99. Undifferentiated gastric carcinoma with lymphoid stroma (lymphoepithelioma-like carcinoma/medullary carcinoma) / S.M. Falzarano, V. Mourmouras, M.G. Mastrogiulio et al. // *Pathologica.*-2009.-Vol.101(1).-P.15-17.
100. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review) /Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. et al.. // *Int. J. Oncol.*- 2015.-Vol.46(4).-P.1421-1434.
101. Yano H. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis / H. Yano, M. Kinuta, H. Tateishi // *Gastric Cancer.*-1999.-Vol.2(1).-P.26-32.

102. Zhang H. Human macrophage metalloelastase expression in gastric cancer and its relationship with gastric cancer prognosis / H. Zhang, Y. Li, G. Xu // J. Exp. Clin.Cancer Res.-2007.-Vol.26(3).-P.361-366.