

М.В. Вусик¹, Р.И. Плешко², Т.В. Авдеенко¹, О.В. Черемисина¹

Прогностическая значимость уровня вирусной нагрузки гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр при инфицировании слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* у больных раком желудка

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск,

²ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Томск

В настоящее время вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) и *H.pylori* (НР) относят к этиопатогенетическим факторам развития предопухолевых изменений в слизистой оболочке желудка и опухолевой прогрессии. Представлены результаты изучения НР-инфицированности, показателей противовирусного гуморального иммунитета к ВЭБ и вирусной нагрузки в опухолевой ткани, а также их прогностическая значимость у 54 с пациентов раком желудка I-IV стадии. Показано, что для больных раком желудка характерны высокие титры IgG к вирусному капсидному антигену (ВКА) (>1:320), IgA к ВКА ($\geq 1:10$) и IgG к ранним антигенам (РА) ВЭБ, что свидетельствует о высокой интенсивности противовирусных иммунных реакций. Выявлены признаки антагонизма между инфектами: высокие титры противовирусных антител (IgG к ВКА, IgG к РА ВЭБ) и высокая интенсивность вирусной нагрузки в опухоли (lg копий ДНК ВЭБ на 10^5 клеток более 3) сочетались с отсутствием НР-инфекции, и, напротив, для большинства НР-положительных больных (81%) были характерны низкие концентрации сывороточных IgG к ВКА. Анализ прогностической значимости параметров, ассоциированных с инфекционными агентами, показал, что только концентрация IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови обладает прогностическим потенциалом в оценке общей выживаемости. Больные раком желудка III-IV стадии, в сыворотке крови которых не определялись IgA к ВКА ВЭБ, имели лучшие показатели двух- и трехлетней общей выживаемости, нежели пациенты с титрами IgA к ВКА ВЭБ $\geq 1:10$ (43,2 \pm 1,7% и 37,7 \pm 1,9% больных, соответственно; при титре $\geq 1:10$ — 12,1 \pm 1,5% и 8,7 \pm 0,9%; $p < 0,05$).

Ключевые слова: вирус Эпштейна — Барр, *Helicobacter pylori*, рак желудка, прогностическая значимость вирусной нагрузки

В России ежегодно диагностируется 45–49 тысяч первичных случаев рака желудка, и, несмотря на продолжающееся снижение стандар-

тизированных показателей заболеваемости и смертности, одногодичная летальность остается стабильно высокой — 49,2-51% [3]. 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. Первичной профилактике РЖ мешают отсутствие четкого специфического причинного фактора, мультифакторная природа рака желудка и высокая стоимость скрининговых программ [4, 6].

Основным звеном в развитии рака желудка являются такие морфологические перестройки, как метаплазия и дисплазия эпителия, возникающие в процессе хронического воспаления. Среди пусковых факторов изменений в слизистой оболочке желудка (СОЖ) ведущее значение имеют *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, НР) и вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) [1]. Исследования показали, что около 70% аденокарцином желудка связаны с НР-ассоциированным хроническим гастритом, при этом развивается карцинома кишечного типа [5]. Помимо ранней диагностики опухоли важной задачей является прогнозирование результатов проведенного лечения и продолжительности жизни пациентов. На это изначально нацелена TNM-классификация рака желудка, будучи выражением поэтапной модели. Однако, несмотря на появление все новых её редакций (TNM-1997; TNM-2000), потребность в повышении точности прогноза сохраняется. В настоящее время в качестве прогностических маркеров продолженного роста рака желудка и метастазов предлагаются раковый эмбриональный антиген и углеводные антигены СА 19-9 и СА 72-4, одновременное определение которых повышает диагностическую чувствительность до 83% [7]. В то же время эти маркеры не являются органоспецифичными и малоэффективны для прогноза выживаемости у пациентов III — IV стадии рака желудка. В связи с этим особую актуальность приобретает поиск новых прогностических критериев оценки общей и безрецидивной выживаемости при гастроканцерогенезе.

Цель исследования. Оценить прогностическую значимость уровня вирусной нагрузки, гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр и инфицирования слизистой оболочки *H.pylori* у больных раком желудка.

Материалы и методы

В исследование были включены 54 пациента, страдающие раком желудка I–IV стадии и находившиеся на стационарном лечении в торако-абдоминальном отделении Томского НИИ онкологии. Средний возраст составил 59,5±1,9 лет, в исследовании преобладали мужчины. По гистологическому типу больные раком желудка распределились следующим образом: у 6 больных диагностирован перстневидно-клеточный рак, у 48 больных — аденокарцинома, в том числе у 2 пациентов была выявлена высокодифференцированная, у 20 — умереннодифференцированная и у 26 — низкодифференцированная формы. Стадия T1N0M0 была выявлена у 3 пациентов, II стадию имели 6 больных (T2N0M0 — 4, T2N1M0 — 2). Пациенты III стадии распределились следующим образом: T3N0M0-11, T3N1M0-10, T3N2M0-10. Четвертую стадию процесса имели 14 пациентов (T4N1M0-4, T4N2M0-3, T4N3M0 -7).

Эндоскопическое обследование проводили с помощью видеостойки фирмы «Olympus» Exega II. Степень обсеменности СОЖ инфекцией *H. pylori* оценивалась на цитологических мазках методом световой микроскопии. При этом учитывались три степени обсеменности 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.

Определение ДНК вируса Эпштейна-Барр в биопсийном материале осуществлялось методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Для количественного теста производился расчет концентрации в логарифмах копий ДНК ВЭБ на стандартное количество клеток (10⁵) в контрольных и исследуемых опухолевых образцах.

Для определения специфических антител к антигенам литической инфекции ВЭБ (IgG и IgA к вирусному капсидному антигену (ВКА) и IgG к комплексу ранних антигенов (РА)) проводился забор венозной крови больных по традиционной методике. В качестве тест-системы использовали фиксированные препараты суспензионной вируспродуцирующей клеточной линии P3HR1. 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 и IgG к комплексу РА — более или равный 1:10. При анализе противовирусных антител в сыворотке крови у больных раком желудка группой сравнения явились 52 пациента с дисплазией слизистой желудка I–III степени. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы STATISTICA 6.0 и включала опре-

деление одностороннего критерия Фишера или критерия Хи-квадрат для качественных признаков. Прогностическая значимость признаков в отношении общей и безрецидивной выживаемости у больных раком желудка оценена с использованием программы Survival Analysis, кривые кумулятивной выживаемости строились по методу Каплана-Майера. Различия считались значимыми при p<0,05.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ противовирусных антител в сыворотке крови показал, что у больных раком желудка чаще встречались высокие титры IgG к ВКА (>1:320), чем у больных контрольной группы с диспластическими процессами (52 пациента) в СОЖ. Частота встречаемости в сыворотке крови IgA к ВКА и IgG к РА у пациентов с раком желудка и дисплазиями не различались (табл. 1).

Оценка вирусной нагрузки ВЭБ в гастробиоптатах позволила разделить всех больных раком желудка на 2 группы: со слабой степенью вирусной нагрузки (логарифм числа копий ДНК менее 3) и высокой степенью нагрузки (≥ 3). Анализ показал, что в большинстве случаев (n=48) в опухоли определялось слабо выраженное носительство ВЭБ, высокая вирусная нагрузка отмечена только у 6 обследованных пациентов. Примечательно, что низкое содержание копий ДНК ВЭБ в опухоли у половины больных сочеталось с отсутствием в крови IgA к ВКА и IgG к РА ВЭБ, а у 69% (33) пациентов отмечались низкие титры IgG к ВКА. В то же время значительная часть больных с низкой степенью носительства ВЭБ в опухолевой ткани имела высокие титры IgG к РА (50%), IgA к ВКА (52%) и IgG к ВКА (31%), что может быть отражением системного ответа на вирусную инфекцию, персистирующую в организме пациентов. Увеличение числа вирусных копий ДНК в опухоли (≥3) сопровождалось усилением гуморальных реакций и преобладанием среди таких больных лиц с диагностически значимыми титрами IgA к ВКА (83%), IgG к РА (83%) и высокой концентрацией (>1:320) IgG к ВКА (66%).

Бактериологическое исследование гастробиоптатов показало, что колонизация СОЖ хеликобактериями у опухолевых больных встречалась лишь в 16 случаев. При этом для большинства НР-позитивных больных (81%) были характерны низкие концентрации сывороточных IgG к ВКА

Таблица 1. Показатели гуморального иммунитета к вирусу Эпштейна-Барр у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и раком желудка

Параметр	Титр Ig A к ВКА		Титр Ig G к ВКА		Титр Ig G к РА	
	Антитела не выявлены	≥1:10	≤1:320	>1:320	Антитела не выявлены	≥1:10
Аденокарцинома желудка, n=54	31	23	43	11	31	23
Диспластические изменения СОЖ, n=52	30	22	52	0	30	22
χ ²	0.028(p>0.05)		11.819(p<0.05)		0.028(p>0.05)	

Таблица 2. Концентрация противовирусных антител к вирусу Эпштейна-Барр в сыворотке крови у больных раком желудка в зависимости от наличия НР-инфекции

Наличие НР-инфицированности в СОЖ	Титр IgG к ВКА		Титр IgA к ВКА		Титр IgG к РА	
	<1:320	≥1:320	Антител не выявлено	≥1:10	Антител не выявлено	≥1:10
НР-положительные, n= 16	13	3	8	8	9	7
НР-отрицательные, n=32	10	22	18	14	12	20
χ ²	10.685 (p<0,05)		0.168 (p>0,05)		1.524(p>0,05)	

Примечание: P — уровень значимости различий между показателями Нр-положительных и Нр-отрицательных больных

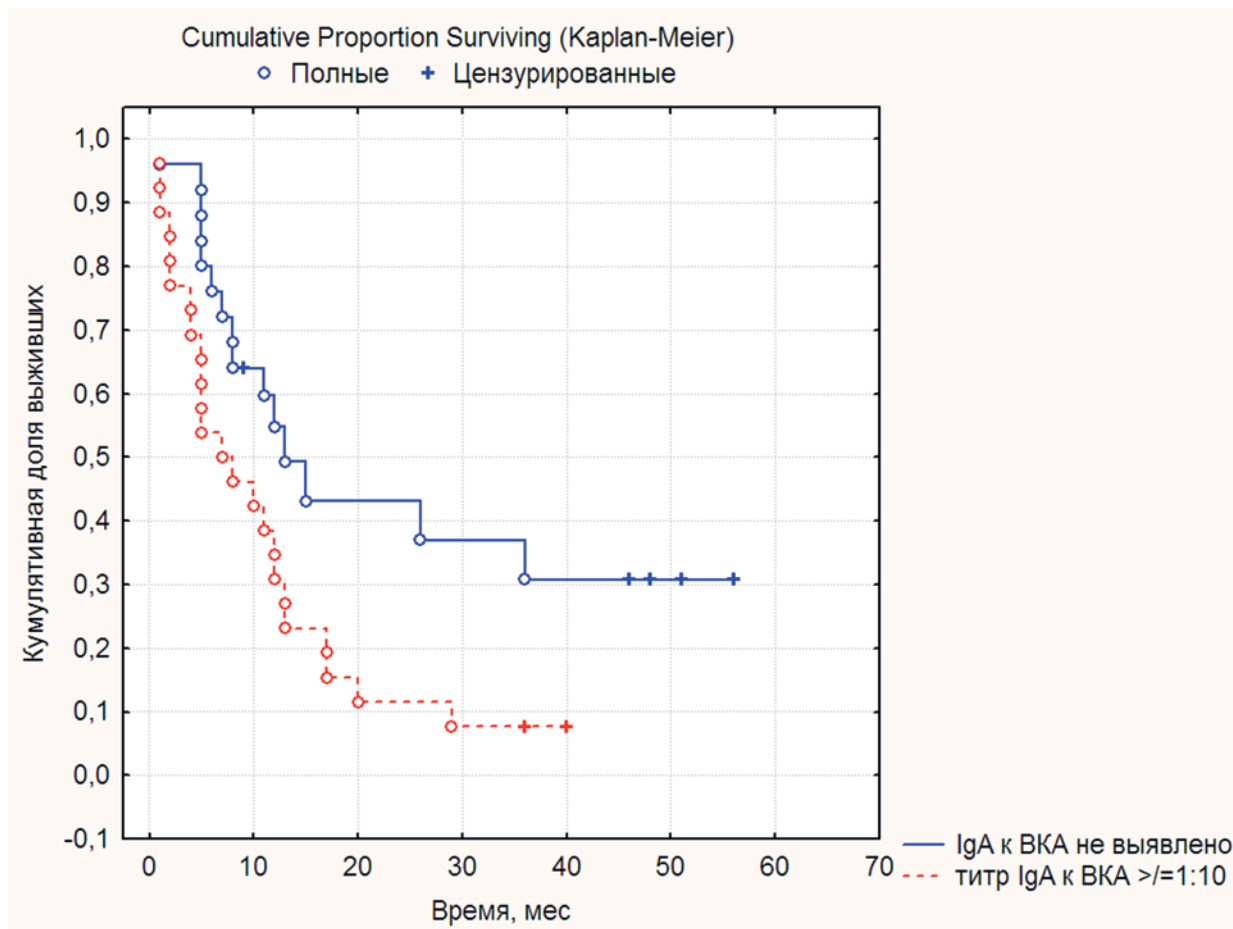


Рис.1. Общая выживаемость больных раком желудка в зависимости от титра IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови

Примечание: сплошная линия — выживаемость больных, в сыворотке крови которых IgA к ВКА ВЭБ не определялись, пунктирная линия — выживаемость пациентов с титром IgA к ВКА ВЭБ ≥1:10. По оси абсцисс — время после оперативного этапа лечения (мес.), по оси ординат — кумулятивная выживаемость, рассчитанная по методу Каплан-Мейера

при равной встречаемости диагностически значимых титров IgA к ВКА и IgG к РА (табл. 2). Напротив, среди опухолевых больных, в СОЖ которых контаминация *H.pylori* не выявлялась, достоверно чаще определялись высокие титры IgG к ВКА и IgG к РА (табл. 2), что может демонстрировать более высокую выраженность противовирусных иммунных реакций у этой категории больных.

Полученные результаты могут свидетельствовать об антагонистическом характере вирусной и бактериальной (хеликобактериальной) инфекции в организме, в том числе, при канцерогенезе

в слизистой желудка. Это подтверждают и наши результаты оценки степени вирусной нагрузки в опухолевой ткани в зависимости от НР-инфицированности. Оказалось, что высокий уровень вирусной нагрузки (≥3) выявлялся только в НР-отрицательных РЖ (у 5 больных из 29), что оказалось статистически значимым.

Оценка прогностической значимости инфицированности *H. pylori* и вирусом Эпштейна-Барр в появлении рецидивов заболевания и летальных исходов у больных раком желудка III-IV стадии проводилась посредством однофакторного анализа. Было показано, что сте-

пень вирусной нагрузки в опухоли, наличие НР в СОЖ, титры IgG к ВКА и IgG к РА ВЭБ не имеют прогностической значимости в отношении безрецидивной выживаемости. В то же время для общей выживаемости больных раком желудка III-IV стадии оказался статистически значимым уровень IgA к ВКА ВЭБ (рис. 1). Оказалось, что пациенты, в сыворотке крови которых не определялись IgA к ВКА ВЭБ, имели лучшие показатели выживаемости, по сравнению с теми, у кого их концентрация составляла $\geq 1:10$. Так, двухлетняя общая выживаемость у больных с неопределяющимися IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови составила $43,2 \pm 1,7\%$ ($12,1 \pm 1,5\%$ — при титрах $\geq 1:10$), а трехлетняя общая выживаемость — соответственно, $37,7 \pm 1,9\%$ и $8,7 \pm 0,9\%$.

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают значимую роль вируса Эпштейна-Барр в гастроканцерогенезе и открывают возможность прогнозирования развития опухолевого процесса по выраженности гуморальных противовирусных реакций. Наличие высоких титров сывороточных антител к ВЭБ является признанным маркером многих злокачественных новообразований (рака гортани, глотки и носоглотки, околоносовых пазух, лимфомы Беркитта и т.д.) [2, 8]. Наши исследования продемонстрировали корреляцию выраженности гуморальных противовирусных реакций со степенью вирусной нагрузки в опухолевой ткани, что говорит в пользу возможности определения вирус-специфических антител в качестве диагностического маркера для выявления ВЭБ-положительных злокачественных опухолей. Вместе с тем не стоит забывать, что лимфотропность ВЭБ и усиленная лимфоцитарная инфильтрация опухолевой ткани у больных раком желудка ($p < 0,05$) может также приводить к увеличению числа выявляемых в образце копий ДНК ВЭБ. Это подтверждается исследованиями J.L. Ryan et al. (2009), в которых показано, что в EBER-негативных карциномах желудка при гибридизации *in situ* определяются вирусные РНК EBER-1 и EBER-2, и локализованы они в лимфоцитах [9]. Показательно, что высокая противовирусная активность отмечалась преимущественно у пациентов с отсутствием *H. Pylori* на СОЖ. Учитывая то, что исследованиям подвергались больные с III-IV стадиями рака желудка, можно предположить о создании в ВЭБ-положительных опухолях неблагоприятных для жизнедеятельности хеликобактерий условий. Возможно, элиминации *H. Pylori* способствуют вирус-опосредованная трансформация слизистой оболочки и/или изменение функционального статуса «инфицированных» лимфоцитов, входящих в состав воспалительного

инfiltrата. Об участии лимфоидной популяции в механизмах опухолевой прогрессии свидетельствует попадание IgA к ВКА ВЭБ в прогностические признаки для оценки общей выживаемости. Функциональная направленность этого иммуноглобулина связана с защитой слизистых оболочек, а в его образовании существенную роль играют сами эпителиоциты (синтез секреторного компонента). Вероятно, усиление секреции этой фракции противовирусных антител может свидетельствовать об увеличении объема трансформированной ткани, вовлечении лимфоцитов в процесс селекции опухолевых клеток. Появление в опухоли новых субклонов, адаптированных к окружению и способных к росту, инвазии и метастазированию, могут стать основой для снижения двух- и трехлетней общей выживаемости, которую мы отмечали у больных с определяющимися в сыворотке крови IgA к ВКА ВЭБ в титрах $\geq 1:10$.

Выводы

1. У больных раком желудка высокие значения вирусной нагрузки в опухоли (lg копий ДНК ВЭБ > 3) и титров IgG к ВКА ВЭБ ($\geq 1:320$) сочетаются с отсутствием НР-инфекции.

2. Исследование концентрации IgA к ВКА ВЭБ в сыворотке крови у больных раком желудка III-IV стадии может быть использовано в качестве дополнительного прогностического критерия выживаемости пациентов: лучшие показатели выживаемости имеют пациенты, в сыворотке крови которых не определяется IgA к ВКА ВЭБ (двухлетняя общая выживаемость — у $43,2 \pm 1,7\%$ больных, трехлетняя — в $37,7 \pm 1,9\%$ случаев; при титре $\geq 1:10$ — $12,1 \pm 1,5\%$ и $8,7 \pm 0,9\%$ соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеенко Т.В., Вусик М.В., Плешко Р.И. и др. Роль инфекционной составляющей и воспалительного инfiltrата в патогенезе рака желудка // Сибирский онкологический журнал. — 2011. — № 5. — С. 79-86.
2. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В. и др. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц // Вопросы вирусологии. — 2015. — Т. 60. — № 2. — С. 11-17.
3. Давыдов М.И., Туркин И.Н., Полоцкий Б.Е. Результаты хирургии раннего рака желудка // Вестник Московского онкологического общества. — 2008. — № 9. — С. 2-8.
4. Канцерогенез // Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
5. Павлович И.М. Атрофический гастрит (клиническая и функционально-морфологическая характеристика

ка, критерии риска опухолевой трансформации // РЖГК. — 2008. — № 1. — С. 85-86.

6. Степанов И.В., Завьялова М.В., Григорьева Е.С. и др. Клинико-морфологические и молекулярно-генетические особенности интестинального и диффузного типов карцином желудка // Сибирский онкологический журнал. — 2010. — № 4. — С. 55-66.
7. Хрыков Г.Н. Роль опухолевых маркеров в диагностике метастазов рака желудка и толстой кишки: автореф. дис....канд. мед. наук. — Санкт-Петербург, 2007. — 24 с.
8. Bautista-Quach M.A., Ake C.D. Chen gastrointestinal lymphomas: morphology, immunophenotype and molecular features // J. Gastrointest. Oncol. — 2012. — Vol. 3(3). — P. 209-225.
9. Ryan J.L., Morgan D.R., Dominguez R.D. et al. High levels of Epstein-barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma // Lab. Invest. — 2009. — Vol. 89(1). — P. 80-90.

Поступила в редакцию 30.01.2017 г.

*M.V. Vusik¹, R.I. Pleshko², T.V. Avdeenko¹,
O.V. Cheremisina¹*

Prognostic significance of viral load and humoral immune response to Epstein Barr virus in gastric cancer patients infected with *Helicobacter pylori*

¹Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center
²Siberian State Medical University
Tomsk

Both Epstein-Barr virus (EBV) and *H. pylori* (HP) have been implicated in the carcinogenesis of the stomach. The results of studying HP-infection, antiviral humoral immune response to EBV and viral load in tumor tissues as well as their prognostic significance were analyzed in 54 patients with stage I-IV gastric cancer. It was shown that high titers of IgG to viral capsid antigen (VCA) ($>1:320$), IgA to VCA ($\geq 1:10$) and IgG to EBV early antigens (EA) were typical for gastric cancer patients, thus indicating high antiviral immune responses. High titers of antiviral antibodies (IgG to VCA, IgG to EBV EA) and high intensity of viral load in the tumor (more than 3 copies of EBV DNA per 10^5 cells) were found to correlate with absence of HP infection. On the contrary, low concentrations of serum IgG to VCA were observed in most HP-positive patients (81%). The analysis of prognostic significance of parameters associated with infectious agents showed that the only concentration of IgA to EBV VCA in blood serum had a prognostic potential in the assessment of overall survival. The 2- and 3-year overall survival rates were higher in gastric cancer patients in whom serum *EBV VCA-IgA* antibody titers were not detected than in patients with serum *EBV VCA-IgA* antibody titers of $\geq 1:10$ ($43.2 \pm 1.7\%$ and $37.7 \pm 1.9\%$ versus $12.1 \pm 1.5\%$ and $8.7 \pm 0.9\%$, respectively; $p < 0.05$)

Key words: Epstein-Barr virus, *Helicobacter pylori*, gastric cancer, prognostic significance, viral load