

ПРЕДИКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ В МАЛИГНИЗАЦИИ *H. PYLORI*-АССОЦИИРОВАННОГО ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА

Е. П. Голубинская¹, Т. П. Сатаева¹✉, И. И. Фомочкина¹, А. В. Кубышкин¹, Т. П. Макалиш¹, Н. А. Школяр², А. А. Галышевская¹, Д. В. Варгхесе¹

¹ Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Опухоль-ассоциированные макрофаги способны регулировать пролиферацию опухолевых клеток и влиять на процессы их диссеминации. Целью исследования было оценить предиктивный потенциал иммуногистохимического фенотипирования макрофагальной популяции при ранней малигнизации *H. pylori*-ассоциированного хронического гастрита. Материалом для исследования послужили гастриобиоптаты инфицированных *Helicobacter pylori* пациентов обоего пола в возрасте $48 \pm 7,2$ лет, разделенных на три группы: хронический неатрофический гастрит (ХНГ, $n = 10$), хронический атрофический гастрит (ХАГ, $n = 10$), аденокарцинома желудка G1-G2 (АКЦ, $n = 10$). Макрофагальную популяцию визуализировали с помощью панмакрофагального маркера CD68 и маркера моноцитов/макрофагов 2-го типа CD163. Интенсивность неоваскулогенеза определяли с использованием маркера эндотелия сосудов CD31 путем оценки суммарной площади поперечного сечения сосудов. Установлено, что хронический гастрит сопровождается динамическим увеличением общей популяции макрофагов по мере нарастания атрофических и неопластических процессов. По данным иммуногистохимического исследования биоптатов, у группы пациентов с ХНГ соотношение CD163 : CD68 составило $0,67 \pm 0,02$, а суммарная площадь поперечного сечения сосудов была равна $3590,92 \pm 356,27$ мкм². Атрофический гастрит и аденокарцинома характеризуются векторным перераспределением моноцитов/макрофагов во второй функциональный фенотип. Индекс экспрессии CD163 : CD68 в группе с ХАГ составляет $0,81 \pm 0,04$, а в группе с АКЦ — $0,88 \pm 0,03$. Площадь микроциркуляторного русла в группах с ХАГ и АКЦ значительно возрастает, что отражает интенсификацию процессов неоваскулогенеза в опухоли под влиянием моноцитов/макрофагов M2. Усиленная экспрессия CD163 может служить предиктором малигнизации хронического гастрита в комплексе с оценкой степени атрофии и метаплазии эпителия железистого компонента.

Ключевые слова: рак желудка, гастрит, аденокарцинома, опухоль-ассоциированные макрофаги, *Helicobacter pylori*

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания № ФЗЭГ-2020-0060 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в области научных исследований по теме «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с использованием клеточных и генетических технологий».

Вклад авторов: Е. П. Голубинская — анализ клинических данных, проведение иммуногистохимического исследования, редактирование рукописи; Т. П. Сатаева, И. И. Фомочкина — систематический анализ, написание рукописи; А. В. Кубышкин — статистический анализ полученных данных, редактирование рукописи; Т. П. Макалиш — подготовка материала для морфологического исследования, проведение иммуногистохимического исследования; Н. А. Школяр — сбор и подготовка биоптатов; А. А. Галышевская, Д. В. Варгхесе — обработка морфометрических данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол №15 от 5 декабря 2020 г.), проведено в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), Стандартами надлежащей клинической практики (GCP) и ФЗ № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Павловна Сатаева
Бульвар Ленина д. 5/7, г. Симферополь, 295006, Россия; tanzcool@mail.ru

Статья получена: 19.08.2021 **Статья принята к печати:** 03.09.2021 **Опубликована онлайн:** 13.09.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.044

PREDICTIVE POTENTIAL OF MACROPHAGE POPULATION PHENOTYPING IN MALIGNIZATION OF *H. PYLORI*-ASSOCIATED CHRONIC GASTRITIS

Golubinskaya EP¹, Sataieva TP¹✉, Fomochkina II¹, Kubyshkin AV¹, Makalish TP¹, Shkolyar NA², Galyshevskaya AA¹, Varghese DV¹

¹ V.I. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Russia

² Sechenov University, Moscow, Russia

Tumor-associated macrophages are able to regulate the tumor cell proliferation and to affect the tumor cell dissemination. The study was aimed to assess the predictive potential of the macrophage population immunohistochemical phenotyping in early malignization of *H. pylori*-associated chronic gastritis. Gastric biopsy samples of male and female patients aged 48 ± 7.2 infected with *Helicobacter pylori* were used as the research material. The patients were divided into three groups: non-atrophic chronic gastritis (NACG, $n = 10$), atrophic chronic gastritis (ACG, $n = 10$), G1/G2 gastric adenocarcinoma (GAC, $n = 10$). The macrophage population was visualized using the CD68 pan-macrophage marker and the type 2 monocyte/macrophage marker CD163. Intensity of neoangiogenesis was defined using the CD31 endothelial marker by assessing the total cross sectional area of blood vessels. It was found that chronic gastritis was accompanied by the dynamic increase in the size of the general macrophage population with the progression of atrophic and metaplastic processes. According to immunohistochemical study of biopsies obtained from patients with NCG, the CD163 : CD68 ratio was 0.67 ± 0.02 , and the total cross sectional area of blood vessels was 3590.92 ± 356.27 μm². Atrophic gastritis and adenocarcinoma were characterized by vector redistribution of monocytes/macrophages into the 2nd functional phenotype. The CD163 : CD68 expression index in the group with ACG was 0.81 ± 0.04 , and in the group with GAC it was 0.88 ± 0.03 . Microvascular area was significantly increased in the groups with ACG and GAC, which reflected tumor neoangiogenesis intensification under the influence of M2 monocytes/macrophages. The increased expression of CD163 can serve as a predictor of chronic gastritis malignization together with evaluation of the glandular epithelium atrophy and metaplasia degree.

Keywords: gastric cancer, gastritis, adenocarcinoma, tumor-associated macrophages, *Helicobacter pylori*

Funding: the study was carried out within the framework of the Government Assignment № FZEG-2020-0060 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the field of scientific research "Algorithms for molecular genetic diagnosis of malignant neoplasms and approaches to their targeted therapy using cellular and genetic technologies".

Author contribution: Golubinskaya EP — clinical data analysis, immunohistochemistry, manuscript editing; Sataieva TP, Fomochkina II — systematic analysis, manuscript writing; Kubyshkin AV — statistical analysis, manuscript editing; Makalish TP — sample preparation for morphological assessment, immunohistochemistry; Shkolyar NA — biopsy sample collection and preparation; Galyshevskaya AA, Varghese DV — morphometric data processing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Medical Academy named after S. I. Georgievsky (protocol № 15 dated December 5, 2020); the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki 1964 (revised in 1975 and 1983), Good Clinical Practice (GCP) standards and the Federal Law № 323-FZ "On the Basics of Protecting the Health of Citizens in the Russian Federation" dated November 21, 2011. The informed consent was submitted by all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana P. Sataieva
Bulvar Lenina, 5/7, Simferopol, 295006, Russia; tanzcool@mail.ru

Received: 19.08.2021 **Accepted:** 03.09.2021 **Published online:** 13.09.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.044

В настоящее время рак желудка занимает пятое место по заболеваемости и третье по смертности не только в Российской Федерации, но и во всем мире. Значительный рост числа молодых пациентов с данным заболеванием стал поводом для проведения многочисленных исследований, направленных на выявление ранних предикторов канцерогенеза и критических факторов риска малигнизации [1, 2].

Среди патогенных факторов рака желудка инфицирование *Helicobacter pylori* (HP) является основной причиной этого заболевания. Доказано, что у 80% больных раком желудка в анамнезе отмечалось присутствие HP [3, 4]. Нет сомнений, что HP является одним из решающих факторов в каскадном процессе канцерогенеза, инициируя развитие острого гастрита, пролонгацию его в хронический с последующей атрофической, метапластической и диспластической трансформацией, что в конечном счете приводит к развитию аденокарциномы [5].

В последние годы все больше исследований сосредоточено на изменениях в опухолевом микроокружении. Особый интерес вызывает изучение опухоль-ассоциированных макрофагов (ОАМ) [6]. ОАМ связаны с возникновением опухолей, играя ключевую роль в метастазировании, а также иммунной регуляции новообразований. В настоящее время установлен факт функциональной неоднородности макрофагов. Выделяют макрофаги 1-го типа, инициирующие развитие провоспалительных реакций, и 2-го типа с ремоделирующей направленностью, которые могут стимулировать миграцию и инвазию опухолевых клеток за счет активации неоангиогенеза [7–9].

Известно, что HP способна активно рекрутировать макрофаги, моноциты и дендритные клетки в слизистую оболочку желудка — она заставляет их секретировать провоспалительные цитокины и хемокины, вызывая воспаление и повреждение слизистой оболочки желудка [10, 11]. В ряде исследований сообщали о влиянии HP-инфекции на поляризацию макрофагов за счет стимуляции процессов свободнорадикального окисления. По результатам ряда научных исследований установлено, что под воздействием бактериальных факторов происходит усиленная генерация активных форм кислорода и гипоксией индуцированного фактора-1 α [8, 9]. Кроме того, HP обладает способностью синтезировать большое количество индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), способствуя поляризации макрофагов по фенотипу M2, которые, в отличие от M1, обладают довольно слабой фагоцитарной активностью, что таким образом способствует дальнейшей персистенции возбудителя [12].

В настоящее время эндоскопическое исследование с прицельной биопсией является основным методом диагностики атрофического гастрита и его осложнений. Однако для HP-ассоциированного атрофического гастрита весьма характерен очаговый характер изменений, поэтому для получения правильного морфологического заключения о направленности патологического процесса необходимо обеспечить адекватное получение биопсионного материала, что в условиях амбулаторного звена нередко бывает затруднительно [13]. Вместе с тем, раннее выявление атрофии и последующих предраковых изменений (кишечной метаплазии и дисплазии) является неперенным условием профилактики рака желудка. Одним из путей решения этой проблемы может служить иммуногистохимическая верификация морфологических изменений иммунных клеток слизистой оболочки желудка.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы было оценить предиктивный потенциал иммуногистохимического фенотипирования макрофагальной популяции при ранней малигнизации HP-ассоциированного хронического гастрита.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Морфологические исследования проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Молекулярная биология» Медицинской академии им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» при поддержке программы развития КФУ. Материалом для исследования послужили гистобиоптаты пациентов обоего пола в возрасте $49 \pm 7,2$ лет, разделенных на три группы: хронический неатрофический гастрит (ХНГ, $n = 10$), хронический атрофический гастрит (ХАГ, $n = 10$), тубулярная аденокарцинома желудка G1-G2, кишечный тип по Лаурен (АКЦ, $n = 10$). Критерии включения в исследуемые группы: положительный анализ на HP. Критерии исключения: отрицательный анализ на HP или отсутствие анамнестических сведений о выполнении указанного анализа. Согласно анамнестическим данным, все пациенты были HP-положительными. Верификацию HP осуществляли на основании количественного определения иммуноглобулинов класса G (IgG) к HP в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа и быстрого уреазного дыхательного теста.

Контрольную группу составили фрагменты визуально интактной слизистой желудка 10 пациентов, умерших от причин, не связанных с патологией желудочно-кишечного тракта, без гистологических признаков гастрита и не инфицированных HP.

Для проведения морфологического исследования биопсийного и секционного материала фрагменты слизистой желудка фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Проводку и изготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике, с последующей окраской гематоксилином и эозином [14].

Имуногистохимическое исследование (ИГХ) проводили на срезах толщиной 3–4 мкм с применением двойного пероксидаза-антипероксидазного метода в соответствии с протоколами компании Thermo Scientific (США), используя систему визуализации Leica Biosystems (Novocastra; США) и DAB Chromogen (Abcam; Великобритания) с последующим докрасиванием ядер гематоксилином. Макрофагальную популяцию визуализировали с помощью панмакрофагального/моноцитарного маркера CD68 (клон PG-M1, разведение 1:50, DAKO; Дания) и маркера типичных репаративных макрофагов 2 α фенотипа CD163 (клон EPR-19518, разведение 1 : 500, Abcam; Великобритания). Согласно данным метаанализа, именно изучение маркеров CD68 и CD163 более информативно по сравнению с исследованием другого M2 маркера — CD206 [15]. При этом CD163 может экспрессироваться как дополнительный поверхностный маркер моноцитов крови, также способных к фенотипической поляризации. Однако моноциты демонстрируют более низкий уровень экспрессии указанного маркера по сравнению с макрофагами.

Интенсивность неоангиогенеза определяли с использованием маркера эндотелия сосудов CD31 (клон 1A10, Leica Bond; США) путем оценки суммарной площади поперечного сечения сосудов.

Полученный материал анализировали при помощи светового микроскопа CX41 (Olympus; Япония).

Морфометрические исследования проводили с помощью программы Image J (NIH; США) на стандартизованной площади цифрового изображения гистологического среза. Для каждого маркера макрофагов считали клетки с позитивной цитоплазматической реакцией в 10 полях зрения при увеличении 20х/0,50 объектива UPlanFL N (Olympus; Япония) с последующим подсчетом среднего количества клеток в биоптате.

Статистический анализ проводили с применением программы STATISTICA 10.0 для Windows (StatSoft Inc.; США). Для определения нормального распределения использовали коэффициент нормальности Колмогорова–Смирнова. Определяли основные статистические характеристики: среднее (M), ошибку среднего (m). Межгрупповые сравнения морфологических показателей проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с применением критерия Даннета (Q) для сравнения малых по численности выборок с контрольной группой. Межгрупповые различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно данным серологического исследования, в группе больных с ХНГ у 33% обследуемых выявляли титр антител, равный 1 : 5, у 67% — выше 1 : 10. У пациентов с ХАГ титр антител 1 : 5 наблюдался лишь у 10% больных; у 49% обследуемых титр антител был выше 1 : 10, а остальные 41% демонстрировали высокий титр антител — от 1 : 20 до 1 : 80. У 77% пациентов с верифицированной АКЦ титр антител был равен 1 : 20 и выше, а у 23% титр антител составлял от 1 : 5 до 1 : 10.

По данным морфологического исследования, слизистая оболочка желудка в контрольной группе имела типичное строение, представленное выстилкой из цилиндрического эпителия правильной формы, образующего желудочные ямки без признаков гастрита (рис. 1А). В подслизистом слое локализовались единичные резидентные макрофаги как

первого, так и второго фенотипа (рис. 1Б, В). Сосудистый рисунок был четким, умеренно-выраженным. Сосуды были преимущественно представлены капиллярами и венами (рис. 1Г).

При проведении обзорного окрашивания установлено, что гастробиоптаты пациентов с ХНГ характеризовались различной степенью выраженности лимфо-плазмоцитарной инфильтрации (от слабовыраженной до умеренной), а также формированием единичных гиперплазированных лимфоидных агрегатов в строме, повышенной мукоидизацией покровно-ямочного цилиндрического эпителия и фовеолярной гиперплазией. В некоторых зонах биоптатов определялись очаги гиперплазии кислотопродуцирующих желез фундального типа (рис. 2А).

По данным ИГХ-исследования биоптатов группы пациентов с ХНГ, CD68⁺-клетки были равномерно распределены в собственной пластинке слизистой желудка, около половины из них составляли моноциты/макрофаги 2-го типа. Соотношение CD163 : CD68 составило $0,67 \pm 0,02$ (рис. 2Б, В), значительно превышая значения, полученные для контрольной группы ($p < 0,05$). По мнению авторов, сдвиг индекса соотношений моноцитарно-макрофагальных популяций по сравнению с контрольной группой свидетельствует об инициации каскада противовоспалительных реакций.

Суммарная площадь поперечного сечения сосудов при ХНГ составляла $3590,92 \pm 356,27$ мкм², что свидетельствовало о статистически незначимой интенсификации неангиогенеза по сравнению с образцами контрольной группы ($p > 0,05$). При этом варианте гастрита показатель сосудистой площади был минимальным по сравнению с группами пациентов с ХАГ и АКЦ (рис. 2Г; табл.).

Биоптаты пациентов с ХАГ также демонстрировали полиморфизм гистологических изменений. Атрофия железистого компонента была обусловлена двумя принципиально разными процессами — фиброзной

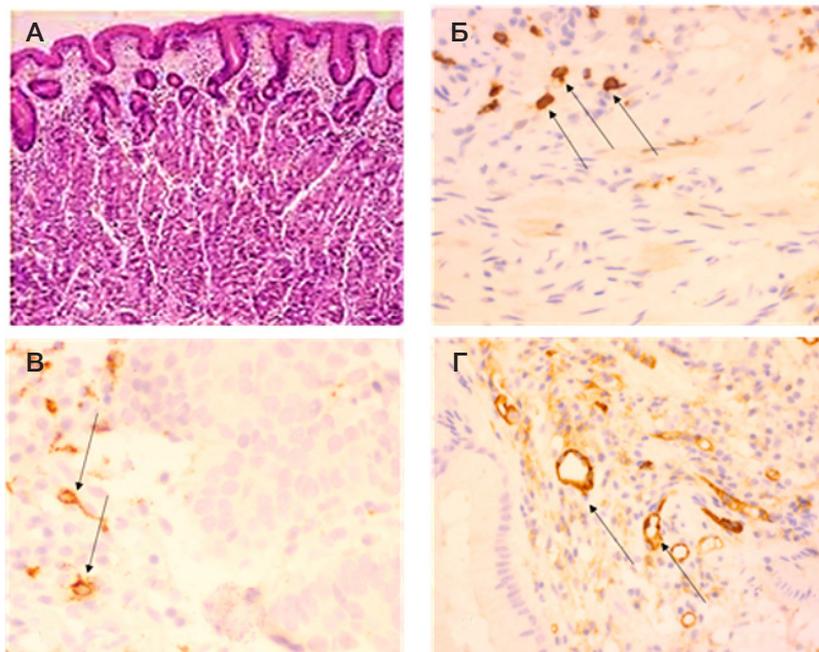


Рис. 1. Строение слизистой оболочки желудка лиц контрольной группы. **А.** Цилиндрический эпителий правильной формы, образующий желудочные ямки, окраска гематоксилином и эозином (×10). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163 в единичных моноцитах/макрофагах 2-го типа, ИГХ (×40). **В.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD68 в общей популяции макрофагов, ИГХ (×40). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31 в эндотелии небольших сосудов, ИГХ (×40)

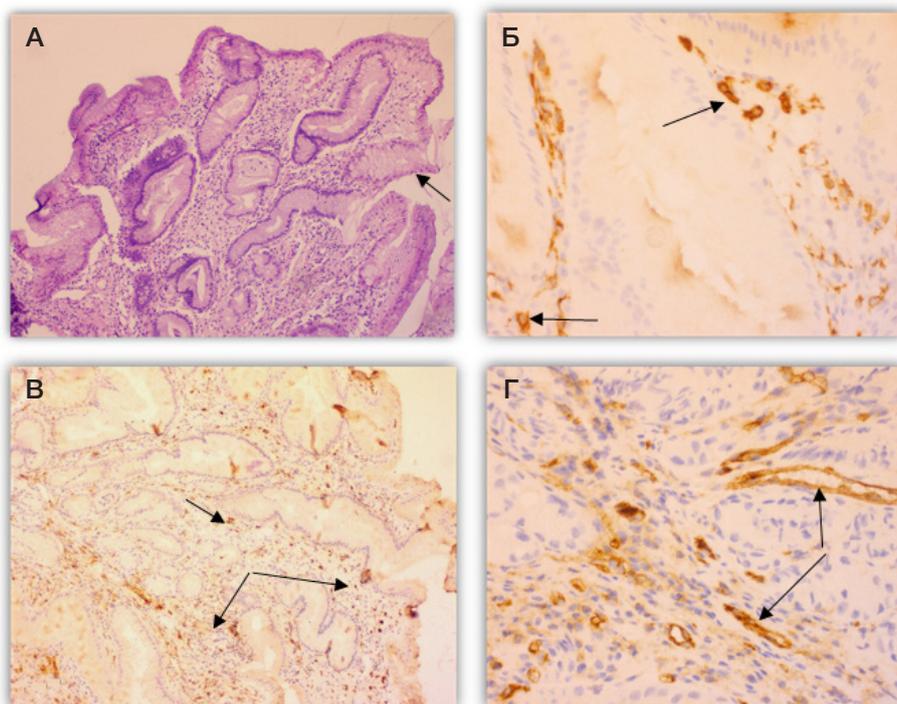


Рис. 2. Хронический неатрофический гастрит. **А.** Умеренно выраженная лимфо-плазмочитарная инфильтрация с примесью единичных лейкоцитов в собственной пластинке слизистой антрального отдела желудка, повышенная мукоидизация покровно-ямочного цилиндрического эпителия, окраска гематоксилином и эозином ($\times 10$). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163 в моноцитах/макрофагах 2-го типа, ИГХ, ($\times 40$). **В.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD68 в общей популяции макрофагов, ИГХ ($\times 10$). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31 в эндотелии сосудов, ИГХ ($\times 40$)

трансформацией стромы или кишечной метаплазией (тонко-/толстокишечной либо комбинацией этих типов метаплазии). Атрофический гастрит с фиброзом собственной пластинки слизистой характеризовался выраженной лимфо-плазмочитарной инфильтрацией, зачастую с наличием лимфоидных фолликулов с расширенными герминативными центрами (рис. 3А).

Моноцитарно-макрофагальная популяция так же равномерно распределялась во всей толще биоптатов — как в области фовеолярных зон, так и вблизи лимфоидных скоплений. Большая часть клеток демонстрировала иммунофенотип моноцитов/макрофагов 2-го типа. Соотношение CD163 : CD68 составило $0,81 \pm 0,04$ (рис. 3Б, В). При этом площадь микроциркуляторного русла в биоптатах данной подгруппы значимо возрастала по сравнению с показателями как группы ХНГ, так и контрольной группы (рис. 3Г).

Морфологические и иммуногистохимические изменения в биоптатах пациентов с верифицированной тубулярной

аденокарциномой были максимально показательными с позиции функционального перепрофилирования макрофагальной популяции и интенсивности неоангиогенеза. Среди тубулярных структур с явлениями клеточной и ядерной атипии, а также участков солидного строения определялось наличие десмопластически измененной стромы с умеренным и выраженным густоклеточным воспалительным инфильтратом из лимфоидных клеток, гистиоцитов, нейтрофилов (рис. 4А).

Количество клеток моноцитарно-макрофагальной популяции увеличилось вдвое по сравнению с показателями ХАГ и четверо по сравнению с ХНГ. Соотношение экспрессии CD163 : CD68 составило $0,88 \pm 0,03$ (рис. 4Б, В). Площадь микроциркуляторного русла также была максимальной, значимо превышая контрольные значения (рис. 4Г), что могло свидетельствовать об интенсификации процессов неоангиогенеза в опухоли для формирования комфортного микроокружения и способствовало метастатической диссеминации опухолевых клеток [16].

Таблица. Данные ИГХ макрофагального звена и микрососудистого русла у больных хроническим гастритом и аденокарциномой

ИГХ маркер	ХНГ (n = 10)	ХАГ (n = 10)	АКЦ (n = 10)	Контрольная группа (n = 10)
CD 68 Абс., (M \pm m)	$39,9 \pm 3,12^*$ Q = 5,90 ($p = 0,00243$)	$62,7 \pm 3,39^*$ Q = 21,59 ($p = 0,00000$)	$132,4 \pm 6,71^*$ Q = 68,99 ($p = 0,00000$)	$31,1 \pm 4,71$
CD 163 Абс., (M \pm m)	$27,5 \pm 2,83^*$ Q = 8,69 ($p = 0,00003$)	$50,5 \pm 3,54^*$ Q = 24,17 ($p = 0,00000$)	$116,7 \pm 10,14^*$ Q = 68,47 ($p = 0,00000$)	$14,7 \pm 3,15$
CD 31 мкм ² , (M \pm m)	$3590,92 \pm 356,27$ Q = 2,07 ($p = 0,48170$)	$8647,02 \pm 359,29^*$ Q = 27,95 ($p = 0,00000$)	$19065,12 \pm 1042,94^*$ Q = 82,37 ($p = 0,00000$)	$3203,68 \pm 347,21$
CD163 : CD68	$0,67 \pm 0,02^*$ Q = 13,97 ($p = 0,00000$)	$0,81 \pm 0,04^*$ Q = 23,75 ($p = 0,00000$)	$0,88 \pm 0,03^*$ Q = 28,64 ($p = 0,00000$)	$0,47 \pm 0,07$

Примечание: * — значимое различие с контрольной группой, $p \leq 0,05$.

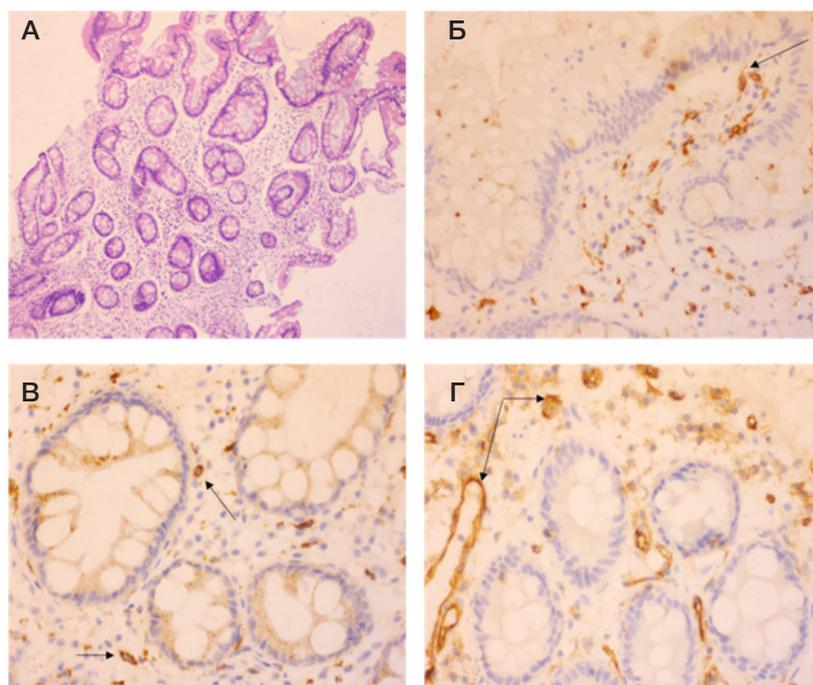


Рис. 3. Умеренно выраженный хронический слабоактивный атрофический метапластический гастрит. **А.** Толстокишечная метаплазия, окраска гематоксилином и эозином ($\times 10$). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163 в моноцитах/макрофагах 2-го типа в собственной пластинке слизистой, ИГХ ($\times 40$). **В.** Позитивная цитоплазматическая экспрессия маркера CD68 в макрофагах собственной пластинки слизистой, ИГХ ($\times 40$). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31 в эндотелии сосудов, ИГХ ($\times 40$)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известные на сегодняшний день молекулярные биомаркеры моноцитов/макрофагов демонстрируют довольно широкие диагностические возможности и могут служить предикторами риска малигнизации за счет специфического выявления той или иной субпопуляции иммунных клеток, что позволяет спрогнозировать течение ряда заболеваний. Доказано, что за счет различных

фенотипов макрофаги могут играть двоякую роль в воспалительных процессах в зависимости от сигналов их микроокружения [17].

Хронический *HP*-ассоциированный гастрит сопровождается динамическим увеличением общей популяции клеток моноцитарно-макрофагального ряда, поскольку известно, что *HP* активно стимулирует запуск цитокинового каскада, который играет основную роль в реализации хронических воспалительных и деструктивных

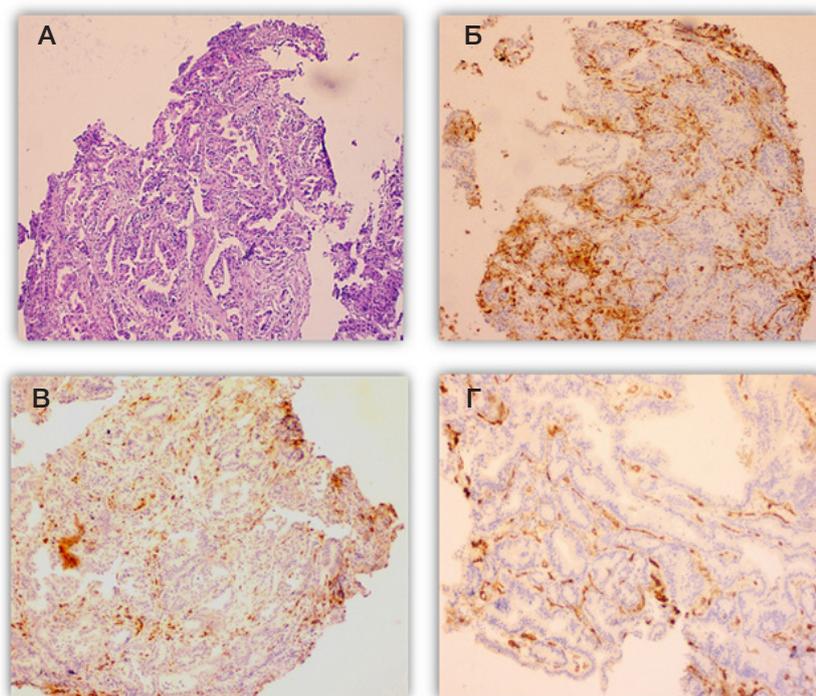


Рис. 4. Аденокарциномы. **А.** Тубулярная аденокарцинома с изъязвлением, окраска гематоксилином и эозином ($\times 10$). **Б.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD163, ИГХ ($\times 100$). **В.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD68, ИГХ ($\times 100$). **Г.** Позитивная цитоплазматическая реакция маркера CD31, ИГХ ($\times 200$)

процессов в слизистой оболочке желудка [4]. Во время острой воспалительной реакции макрофаги обычно поляризуются по M1 фенотипу интерфероном- γ и микробными продуктами, такими как липополисахарид, и оказывают мощное антимикробное действие за счет выработки бактерицидных компонентов (оксида азота и кислородных радикалов) [9]. Однако данная бактерия способна ингибировать действие активных веществ макрофагов за счет их нейтрализации каталазой и супероксиддисмутазой, что способствует ее выживанию. При этом активные формы кислорода, в избытке вырабатываемые макрофагами, приводят к гибели собственных клеток слизистой оболочки желудка, что увеличивает риск развития атрофии [18].

Согласно данным проведенного исследования, атрофический гастрит сопровождается векторным перераспределением моноцитов/макрофагов во 2-й функциональный тип. Макрофаги M2 индуцируются T-хелперами 2-го типа или противовоспалительными цитокинами и факторами роста, включая IL4, IL10 [6]. Очевидно, сдвиг поляризации моноцитов/макрофагов в сторону M2 по мере прогрессирования воспаления должен обеспечивать регенерацию тканей и усиливать гуморальный ответ. Однако длительная усиленная выработка факторов патогенности *HP* может приводить к снижению способности макрофагов элиминировать бактериальные антигены, что приводит к длительной персистенции патогена и хронизации воспаления [19, 20]. С другой стороны, хроническое воспаление с персистирующей поляризацией моноцитов/макрофагов M2 ассоциировано с повышенным риском развития рака желудка [1, 13, 21].

Таким образом, в ходе настоящего исследования наблюдалось динамическое увеличение панмакрофагальной популяции, с прогрессирующим перепрофилированием макрофагов во 2-й функциональный тип по мере трансформации хронического неатрофического гастрита в атрофический и пиковыми значениями в биоптатах с аденокарциномой желудка. По нашему мнению, такие изменения связаны с ремоделирующей функциональной активностью альтернативно активированных моноцитов/макрофагов M2 за счет повышенной экспрессии проангиогенных факторов роста, что способствует, с одной стороны, фиброзной трансформации стромы желудка в условиях прогрессирующего хронического воспаления и тканевой гипоксии, а с другой — создает комфортное микроокружение для диспластических и неопластических

изменений эпителия железистого компонента [11, 22]. Кроме того, известно, что определенные популяции M2 макрофагов обладают выраженными опухолевыми стимулирующими функциями, поскольку участвуют в локальной иммуносупрессии иммунокомпетентных клеток, приводя к ускользанию опухолевых клеток из-под иммунного надзора [23].

Многообразие фенотипов моноцитов/макрофагов требует дальнейшего изучения и стандартизации их предикторного потенциала. Для этого необходимо провести исследования на более объемных выборках пациентов, а также оценить другие макрофагальные маркеры, характерные для клеток моноцитарно-макрофагального ряда. В частности, помимо основных поверхностных маркеров CD1 и CD16 моноциты способны экспрессировать дополнительные поверхностные маркеры CD163, CD204, что может быть выявлено путем двойного иммуноокрашивания [24]. Кроме того, несмотря на общепринятое разделение макрофагов на классические и альтернативные, были описаны другие подтипы макрофагов, включая профиброзные M2-подобные макрофаги, которые продуцируют факторы роста, и фибролитические M2-подобные макрофаги, индуцированные ишемией, которые секретируют протеазы [12].

В целом, выявление механизмов функционального программирования ОАМ позволит выявить мишени для терапевтического воздействия и разработать новые основанные на сочетании химиопрепаратов и иммуномодулирующих агентов подходы в лечении онкологических больных, направленные на активацию иммунного ответа на опухоль [13]. Синергическое действие этих модальностей может существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Выводы

Хронический *H. pylori*-ассоциированный гастрит сопровождается динамическим увеличением общей популяции макрофагов по мере нарастания атрофических и неопластических процессов. Атрофический гастрит и аденокарцинома сопровождаются векторным перераспределением макрофагов во 2-й функциональный тип. Усиленная экспрессия моноцитарно-макрофагального маркера CD163 может служить одним из предикторов малигнизации хронического гастрита в комплексе с гистологической оценкой степени атрофии и метаплазии эпителия железистого компонента.

Литература

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (2): 69–90.
- Massarrat S, Stolte M. Development of gastric cancer and its prevention. *Arch Iran Med.* 2014; 17 (7): 514–20.
- Cover TL. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk. *MBio.* 2016; 7: e01869–915.
- Mentis AA, Dardiotis E. *Helicobacter pylori* eradication for metachronous gastric cancer: an unsuitable methodology impeding broader clinical usage. *Front Oncol.* 2019 Feb 20; 9: 90. DOI: 10.3389/fonc.2019.00090.
- Mentis AA, Boziki M, Grigoriadis N, Papavassiliou AG. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76: 2477–86.
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010; 11: 889.
- Kim J, Bae J-S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm.* 2016; 6058147.
- Niu Z, Shi Q, Zhang W, et al. Caspase-1 cleaves PPAR (for potentiating the pro-tumor action of TAMs. *Nat Commun.* 2017; 8: 766.
- Lu Y, Rong J, Lai Y, Tao L, Yuan X, Shu X. The degree of *Helicobacter pylori* infection affects the state of macrophage polarization through crosstalk between ROS and HIF-1 α . *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020: 5281795.
- Quiding-Järbrink M, Raghavan S, Sundquist M. Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One.* 2010; 5 (11):

- p.e15018. DOI: 10.1371/journal.pone.0015018.
11. Li W, Zhang X, Wu F, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stromal cells trigger M2 macrophage polarization that promotes metastasis and Emt in gastric cancer. *Cell Death & Disease*. 2019; 10 (12): 918. DOI: 10.1038/s41419-019-2131-y.
 12. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (6): 1801. DOI: 10.3390/ijms19061801.
 13. Song JH, Kim SG, Jin EH, Lim JH, Yang SY. Risk factors for gastric tumorigenesis in underlying gastric mucosal atrophy. *Gut Liver*. 2017; 11: 612–19.
 14. Янин В. Л., Бондаренко О. М., Сазонова Н. А. Методы исследования в цитологии и гистологии. Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015; 65 с.
 15. Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer*. 2019 Jul 23; 10 (19): 4463–72. DOI: 10.7150/jca.33914.
 16. Kloepper J, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 4476–81.
 17. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79 (1): 541–66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
 18. Wang YH, Lv ZF, Zhong Y, Liu DS, Chen SP, Xie Y. The internalization of *Helicobacter pylori* plays a role in the failure of *H. pylori* eradication. *Helicobacter*. 2017; 22 (1). DOI: 10.1111/hel.12324.
 19. Ihrig M, Whary MT, Dangler CA, Fox JG. Gastric helicobacter infection induces a Th2 phenotype but does not elevate serum cholesterol in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 2005; 73: 1664–70.
 20. Kaparakis M, Walduck AK, Price JD, Pedersen JS, van Rooijen N, et al. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2008; 76: 2235–9.
 21. Liu LP, Sheng XP, Shuai TK, Zhao YX, Li B, Li YM. *Helicobacter pylori* promotes invasion and metastasis of gastric cancer by enhancing heparanase expression. *World J Gastroenterol*. 2018; 24 (40): 4565–77. DOI: 10.3748/wjg.v24.i40.4565.
 22. Binnemars-Postma K, Bansal R, Storm G, et al. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J*. 2017; 32: 969–78.
 23. Cortese N, Donadon M, Rigamonti A, Marchesi F. Macrophages at the crossroads of anticancer strategies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019 Jun 1; 24: 1271–83.
 24. Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for monocyte/macrophage-based diagnostics of chronic inflammation. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43 (2): 66–77. DOI: 10.1159/000444943.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61 (2): 69–90.
2. Massarrat S, Stolte M. Development of gastric cancer and its prevention. *Arch Iran Med*. 2014; 17 (7): 514–20.
3. Cover TL. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk. *MBio*. 2016; 7: e01869–915.
4. Mentis AA, Dardiotis E. *Helicobacter pylori* eradication for metachronous gastric cancer: an unsuitable methodology impeding broader clinical usage. *Front Oncol*. 2019 Feb 20; 9: 90. DOI: 10.3389/fonc.2019.00090.
5. Mentis AA, Boziki M, Grigoriadis N, Papavassiliou AG. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76: 2477–86.
6. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010; 11: 889.
7. Kim J, Bae J-S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016; 6058147.
8. Niu Z, Shi Q, Zhang W, et al. Caspase-1 cleaves PPAR (for potentiating the pro-tumor action of TAMs). *Nat Commun*. 2017; 8: 766.
9. Lu Y, Rong J, Lai Y, Tao L, Yuan X, Shu X. The degree of *Helicobacter pylori* infection affects the state of macrophage polarization through crosstalk between ROS and HIF-1 α . *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020: 5281795.
10. Quiding-Järbrink M, Raghavan S, Sundquist M. Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One*. 2010; 5 (11): p.e15018. DOI: 10.1371/journal.pone.0015018.
11. Li W, Zhang X, Wu F, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stromal cells trigger M2 macrophage polarization that promotes metastasis and Emt in gastric cancer. *Cell Death & Disease*. 2019; 10 (12): 918. DOI: 10.1038/s41419-019-2131-y.
12. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (6): 1801. DOI: 10.3390/ijms19061801.
13. Song JH, Kim SG, Jin EH, Lim JH, Yang SY. Risk factors for gastric tumorigenesis in underlying gastric mucosal atrophy. *Gut Liver*. 2017; 11: 612–19.
14. Janin VL, Bondarenko OM, Sazonova NA. Методы исследования в цитологии и гистологии. Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015; 65 с. Russian.
15. Ni C, Yang L, Xu Q, Yuan H, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis. *J Cancer*. 2019 Jul 23; 10 (19): 4463–72. DOI: 10.7150/jca.33914.
16. Kloepper J, et al. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 4476–81.
17. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79 (1): 541–66. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
18. Wang YH, Lv ZF, Zhong Y, Liu DS, Chen SP, Xie Y. The internalization of *Helicobacter pylori* plays a role in the failure of *H. pylori* eradication. *Helicobacter*. 2017; 22 (1). DOI: 10.1111/hel.12324.
19. Ihrig M, Whary MT, Dangler CA, Fox JG. Gastric helicobacter infection induces a Th2 phenotype but does not elevate serum cholesterol in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*. 2005; 73: 1664–70.
20. Kaparakis M, Walduck AK, Price JD, Pedersen JS, van Rooijen N, et al. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2008; 76: 2235–9.
21. Liu LP, Sheng XP, Shuai TK, Zhao YX, Li B, Li YM. *Helicobacter pylori* promotes invasion and metastasis of gastric cancer by enhancing heparanase expression. *World J Gastroenterol*. 2018; 24 (40): 4565–77. DOI: 10.3748/wjg.v24.i40.4565.
22. Binnemars-Postma K, Bansal R, Storm G, et al. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J*. 2017; 32: 969–78.
23. Cortese N, Donadon M, Rigamonti A, Marchesi F. Macrophages at the crossroads of anticancer strategies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019 Jun 1; 24: 1271–83.
24. Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for monocyte/macrophage-based diagnostics of chronic inflammation. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43 (2): 66–77. DOI: 10.1159/000444943.