

ЭКСПРЕССИЯ АПЕЛИНА И МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПИЩЕВОДА ПРИ СОЧЕТАНИИ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЕЙ

Проф. Г. Д. Фадеевко, канд. мед. наук А. Е. Гриднев

ГУ «Национальный институт терапии им. Л. Т. Малой НАМН Украины», г. Харьков

Проведено изучение экспрессии апелина-12 и маркеров воспаления циклооксигеназы (ЦОГ-2) и CD16 клетками слизистой оболочки (СО) пищевода у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ) в сочетании с гипертонической болезнью (ГБ). Исследование проводили на биопсиях пищевода, полученных при видеоскопии у больных с коморбидным течением ГЭРБ и ГБ и у больных с изолированной ГЭРБ и сравнивали их с препаратами неизменной СО пищевода (контроль).

ГЭРБ ассоциируется с повышенной иммунореактивностью апелина-12, ЦОГ-2 и CD16 ($p < 0,05$). Сочетанное течение ГЭРБ и ГБ сопровождается более выраженным возрастанием экспрессии апелина-12 и менее выраженным увеличением экспрессии воспалительных маркеров, чем изолированная ГЭРБ. Выявленные нарушения могут способствовать реализации клеточных механизмов взаимовлияния коморбидной патологии.

Ключевые слова: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, гипертоническая болезнь, слизистая оболочка пищевода, апелин, циклооксигеназа-2, CD16.

ЕКСПРЕСІЯ АПЕЛІНУ І МАРКЕРІВ ЗАПАЛЕННЯ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ СТРАВОХОДУ В РАЗІ ПОЄДНАННЯ ГАСТРОЕЗОФАГЕАЛЬНОЇ РЕФЛЮКСНОЇ І ГІПЕРТОНІЧНОЇ ХВОРОБ

Проф. Г. Д. Фадєєвко, канд. мед. наук О. Є. Гріднєв

Проведено вивчення експресії апеліну-12 і маркерів запалення циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) і CD16 клітинами слизової оболонки (СО) стравоходу у хворих на гастроэзофагеальну рефлюксну хворобу (ГЕРХ) у поєднанні з гіпертонічною хворобою (ГХ). Дослідження проводили на біопсіях стравоходу, отриманих під час відеоскопії у хворих із коморбідним перебігом ГЕРХ і ГХ та у хворих з ізольованою ГЕРХ і порівнювали їх із препаратами незмінної СО стравоходу (контроль).

ГЕРХ асоціювалася з підвищеною імунореактивністю апеліну-12, ЦОГ-2 і CD16 ($p < 0,05$). Поєднаний перебіг ГЕРХ і ГХ супроводжувався вираженішим зростанням експресії апеліну-12 і менш вираженим збільшенням експресії запальних маркерів, ніж ізольована ГЕРХ. Виявлені порушення можуть сприяти реалізації клітинних механізмів взаємовпливу коморбідної патології.

Ключові слова: гастроэзофагеальна рефлюксна хвороба, гіпертонічна хвороба, слизова оболочка стравоходу, апелін, циклооксигеназа-2, CD16.

EXPRESSION OF APELIN AND INFLAMMATORY MARKERS IN THE MUCOSA OF THE ESOPHAGUS WITH A COMBINATION OF GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE AND ESSENTIAL HYPERTENSION

G. D. Fadieienko, O. E. Gridnyev

The aim — the study of the expression of apelin-12 and markers of inflammation cyclooxygenase (COX-2) and CD16 mucosa of the esophagus in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) in combination with essential hypertension (EH). The study was performed on esophageal biopsies obtained by videoendoscopy in patients with comorbidity GERD and EH and patients with isolated GERD and compared them with the preparations unchanged mucosa esophagus (control).

GERD is associated with increased apelin-12 immunoreactivity, COX-2 and CD16 ($p < 0.05$). Combined for GERD and EH is accompanied by a marked increase in the expression of apelin-12 and less pronounced increase in the expression of inflammatory markers than isolated GERD. These disorders can contribute to the implementation of the cellular mechanisms of mutual influence of comorbid pathology.

Keywords: gastroesophageal reflux disease, essential hypertension, esophageal mucosa, apelin, cyclooxygenase-2, CD16.

Формирование гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) как изолированного патологического состояния, так и при коморбидной патологии является следствием сложного комплекса органических

и функциональных факторов, эффекты и взаимодействие которых не всегда подлежат анализу. В наибольшей степени это касается сочетанной патологии, так как в большинстве случаев коморбидность способствует

изменению течения заболевания и нередко росту осложнений. В последние годы отмечается довольно частое сочетание ГЭРБ и сердечно-сосудистых заболеваний, в частности гипертонической болезни (ГБ) [1, 3, 5]. Несмотря на интенсивное исследование как ГЭРБ, так и ГБ, вопросы их коморбидности изучены мало. В наибольшей мере это касается выяснения тканевых и клеточных механизмов реализации взаимовлияния этих заболеваний. С этой точки зрения существенный интерес представляет изучение особенностей состояния слизистой оболочки (СО) пищевода у коморбидных больных, поскольку нарушение баланса между факторами ее агрессии и защиты является ключевым звеном патогенеза ГЭРБ.

В плане изучения патогенетических взаимосвязей ГЭРБ и ГБ особый интерес вызывает не так давно открытый регуляторный пептид апелин. Апелин — новый биологический маркер сердечно-сосудистого и метаболического риска. Необходимо отметить, что точный биологический эффект апелина не совсем ясен. Некоторые исследователи рассматривают его как один из медиаторов контроля дифференциации и роста тканей [7, 8]. Тем не менее, необходимо подчеркнуть, что к настоящему времени, согласно литературным данным, роль апелина в развитии воспалительного процесса еще весьма далека от понимания [13, 14]. К признанным маркерам воспаления относят циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2) — индуцибельный фермент, стимулирующий продукцию провоспалительных простагландинов [9, 15]. Кроме того, важными элементами воспаления являются мононуклеарные НК-клетки (тканевые макрофаги), которые выполняют такие функции, как фагоцитоз и продукцию цитокинов и экспрессируют рецепторы к Fc γ III (CD16) [2, 12]. Провоспалительные медиаторы, секретлируемые этими клетками, могут способствовать развитию заболеваний как пищевода, так и сердечно-сосудистой системы [11, 12].

Цель работы — изучение экспрессии апелина и маркеров воспаления ЦОГ-2 и CD16 клетками СО пищевода у больных ГЭРБ в сочетании с ГБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 89 пациентов с изолированной ГЭРБ и 126 пациентов с ГЭРБ и ГБ 2 стадии 1–3 степеней. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц. Группу с изолированной ГЭРБ составили 42 (47,19 %) пациента мужского пола и 47 (52,81 %) женского, средний возраст которых составил $41,99 \pm 1,57$ года, а средняя длительность ГЭРБ — $9,91 \pm 0,87$ года. В группе с сочетанием ГБ и ГЭРБ было 70 (55,56 %) пациентов мужского пола и 56 (44,44 %) женского, средний возраст которых составил $55,92 \pm 0,91$ года, а средняя длительность ГЭРБ — $8,68 \pm 0,37$ года.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования использовали биопсийный материал, полученный при видеоэндоскопии из СО дистального отдела пищевода на 3 см выше условной циркуляторной линии, соединяющей проксимальные концы складок желудка. Выделяли ГЭРБ с катаральной и эрозивной формами рефлюкс-эзофагита. Дальнейшее исследование проводили на препаратах СО пищевода с признаками эзофагита и сравнивали их с препаратами неизменной СО пищевода (контрольная группа). Основные критерии неизменной СО пищевода — отсутствие макроскопических проявлений воспаления при эндоскопии и любых признаков патологических изменений эпителия, удлинения сосочков, склероза, отека и клеточного инфильтрата при гистологическом анализе.

Экспрессию апелина-12, ЦОГ-2 и CD16 исследовали на парафиновых срезах толщиной 5 мкм непрямым иммуногистохимическим пероксидазным методом с использованием моноклональных антител к апелину (Phoenix, USA), к ЦОГ-2 (Thermo Scientific, Великобритания) и к CD16 (Сорбент, РФ) с последующей инкубацией с диаминобензидином и окрашиванием гематоксилином Майера. Визуализацию проводили с использованием системы детекции UltraVision LP (Thermo Scientific, Великобритания). Препараты изучали на микроскопе Micros MS 300 (Австрия) с использованием цифровой видеокамеры САМ 2800 при световой микроскопии

(об'єктив $\times 40$, окуляр $\times 10$). Для аналізу зображення використовували метод цветної деконволюції [4]. Распространенность экспрессии оценивали в оцифрованном изображении по показателю относительной площади иммунопозитивных структур (%) с помощью компьютерной морфометрической программы BioVision.

Анализ результатов производили с помощью компьютерной программы SPSS 21 для Windows XP. С целью математической обработки данных использовались следующие методы: первичной описательной статистики, t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении нами иммуногистохимического исследования биопсийного материала было выявлено, что наиболее выраженная экспрессия апелина имеет место в периваскулярных и перипапиллярных зонах СО пищевода (рис. 1, 2). Кроме этого, в большинстве случаев экспрессия апелина отмечалась в клетках разных слоев многослойного плоского эпителия и в капиллярах соединительнотканых сосочков. Апельинпозитивное окрашивание было связано как с клеточной мембраной, так и с цитоплазмой.

На фоне достаточно слабо выраженной экспрессии апелина в СО пищевода его иммунореактивность была существенно повышена ($p < 0,05$) при рефлюкс-эзофагите

по сравнению с контролем, что свидетельствует о тесной взаимосвязи нарушения его экспрессии с патологическими реакциями в СО пищевода при ГЭРБ. Средний уровень экспрессии апелина в СО пищевода у больных с изолированной ГЭРБ составил $7,15 \pm 0,29\%$, при сочетанной патологии значения этого показателя были выше и равнялись $8,02 \pm 0,29\%$ ($p < 0,05$). В контрольных препаратах экспрессия апелина была менее выражена, распространенность экспрессии достигала $4,67 \pm 1,7\%$.

Анализ литературных данных показал, что повышение экспрессии апелина связано как с процессами воспаления, так и с гипоксией, патогенетическими факторами, влияние которых является важным звеном в механизмах развития как ГЭРБ, так и ГБ [8, 14]. Данные о роли апелина в развитии воспалительного процесса неоднозначны, а иногда противоречивы. Вместе с тем, не вызывает сомнения стимулирующее влияние гипоксии на экспрессию апелина во многих органах и тканях, в частности в пищеварительном тракте [6].

Имуногистохимическое исследование иммунореактивности ЦОГ-2 выявило существенное повышение ее уровня при рефлюкс-эзофагите по сравнению с контролем ($p < 0,05$), что свидетельствует об увеличении содержания ЦОГ-2 вследствие патологических реакций в СО пищевода при ГЭРБ. В контрольных препаратах экспрессия выявлялась только в 2 случаях, при этом распространенность экспрессии не превышала 1,3 %.



Рис 1. Умеренно выраженная экспрессия апелина в клетках базального и парабазального отделов многослойного плоского эпителия пищевода и строме сосочков. ИГХ реакция. $\times 400$

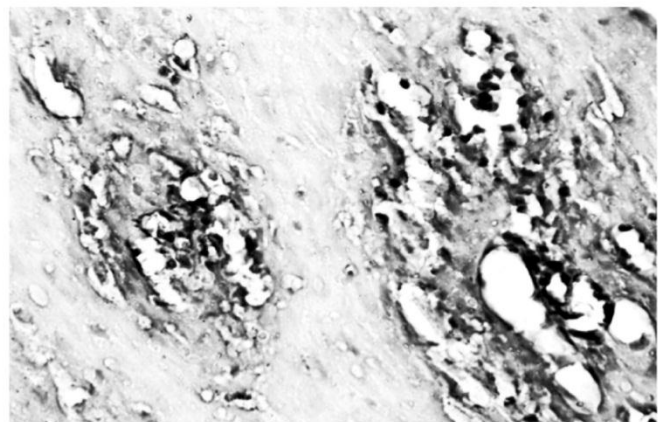


Рис 2. Экспрессия апелина в капиллярах и клетках базальных отделов многослойного плоского эпителия пищевода. ИГХ реакция. $\times 400$

Експресія ЦОГ-2 отличалась у больных с изолированным и коморбидным течением ГЭРБ ($p < 0,05$). Так, распространенность иммунопозитивного окрашивания у больных с изолированной ГЭРБ составила $11,36 \pm 0,29 \%$, а у больных с сочетанием ГЭРБ и ГБ она была менее выраженной — $9,96 \pm 0,26 \%$. Иммунопозитивное окрашивание превалировало в железах пищевода (рис. 3).

В отличие от ЦОГ-1 — фермента, который конститутивно экспрессируется практически во всех тканях, изофермент ЦОГ-2 в нормальных (нетрансформированных) клетках практически не выявляется или экспрессируется в незначительном количестве. В то же время ЦОГ-2 быстро и транзиторно активируется в ответ на воздействие провоспалительных медиаторов и митогенных стимуляторов: цитокинов, эндотоксинов, факторов роста и некоторых онкогенов. Согласно современным представлениям, повышенный уровень ЦОГ-2 в неопластических и стромальных клетках достигается в результате активации целого ряда внутриклеточных сигнальных механизмов. Отмечают тесную взаимосвязь роста экспрессии ЦОГ-2 и таких провоспалительных белков, как индуцибельная NO-синтаза и васкулоэндотелиальный ростовой фактор [10]. В условиях воспаления экспрессия ЦОГ-2 зависит от баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и подавляется глюкокортикоидами, нестероидными противовоспалительными препаратами

[9, 15]. Показано существенное повышение экспрессии мРНК ЦОГ-2 в дистальном отделе пищевода при ГЭРБ [10]. Авторы предполагают, что повышение экспрессии мРНК ЦОГ-2 при ГЭРБ зависит от кислотопродуцирующей функции желудка, и не зависит от эндоскопических и гистологических признаков заболевания.

Существенное повышение экспрессии ЦОГ-2 в СО пищевода у больных ГЭРБ свидетельствует об активации процессов воспаления в СО пищевода как при изолированном, так и коморбидном течении заболевания. Важно отметить, что сочетанная патология не ассоциируется с более выраженной воспалительной активностью.

Иммуногистохимическое определение экспрессии CD16 клетками СО пищевода показало, что содержание CD16⁺ клеток достоверно возрастало как при изолированной ГЭРБ, так и при коморбидной патологии по сравнению с контролем. Локализацию иммунопозитивного окрашивания отмечали в перипапиллярных и периваскулярных зонах, а также в базальном слое эпителия СО пищевода и строме соединительнотканых сосочков (рис. 4).

В литературе представлены доказательства о существенной роли моноцитов/макрофагов в развитии ГБ [12], тем не менее, у пациентов с ГЭРБ и ГБ экспрессия CD16⁺ клеток была менее выражена, чем при изолированном течении ГЭРБ, и составила $3,73 \pm 0,12$ и $4,76 \pm 0,20 \%$, соответственно ($p < 0,05$). В контрольных

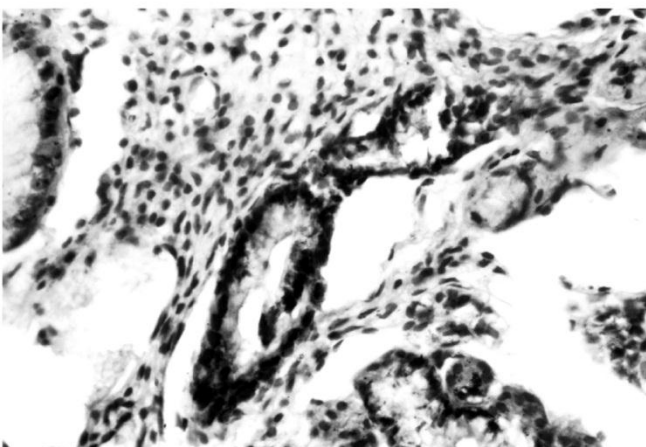


Рис. 3. Хронический эзофагит. Выраженная экспрессия ЦОГ-2 в железах СО пищевода. Непрямой иммуногистохимический метод. $\times 400$

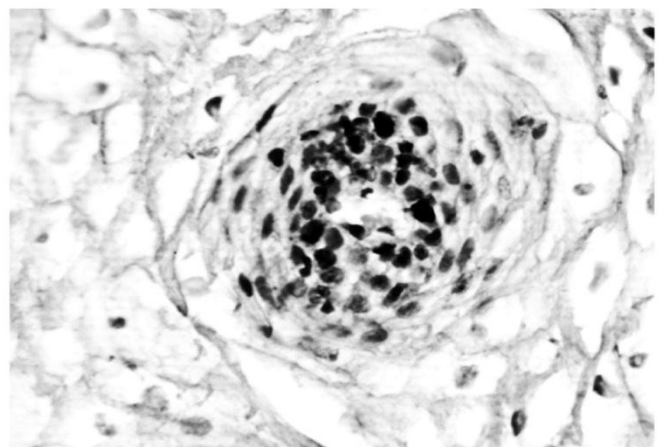


Рис. 4. Экспрессия CD16 в строме сосочков СО пищевода. ИГХ реакция. $\times 400$

препаратах распространенность иммунопозитивного окрашивания равнялась $1,75 \pm 0,06 \%$.

В большинстве случаев повышение количества CD16⁺ клеток ассоциируется с активацией процессов воспаления, поэтому полученные нами результаты прежде всего свидетельствуют о том, что сочетанная патология не приводит к существенному повышению уровня воспаления в СО пищевода по сравнению с изолированной ГЭРБ.

Развитие ГЭРБ ассоциируется с повышенной экспрессией регуляторного пептида апелина и маркеров воспаления в СО пищевода, что свидетельствует о существенной роли хронического воспаления в прогрессировании заболевания. Вместе с тем, сравнительное изучение экспрессии апелина и таких маркеров воспаления, как ЦОГ-2 и CD16 в препаратах СО пищевода у больных изолированной ГЭРБ и у больных ГЭРБ в сочетании с ГБ, выявило некоторые различия в этих группах. Несмотря на то, что у всех больных ГЭРБ существенно возросла иммунореактивность исследуемых факторов по сравнению с контролем, при сочетанной патологии экспрессия апелина превалировала, а повышение экспрессии воспалительных маркеров было несколько ниже, чем при изолированной ГЭРБ.

Скорее всего, сочетание ГЭРБ и ГБ усугубляет нарушение трофики СО пищевода за счет нарушения микроциркуляции и более выраженной гипоксии и может приводить к ее

патологическим изменениям и при отсутствии выраженных признаков воспаления.

ВЫВОДЫ

У пациентов как с сочетанием гастроэзофагеальной рефлюксной и гипертонической болезней, так и с изолированным течением гастроэзофагеальной рефлюксной болезни отмечается существенное возрастание экспрессии регуляторного пептида апелина в железах и сосудах слизистой оболочки пищевода по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При сочетании гастроэзофагеальной рефлюксной и гипертонической болезней экспрессия апелина в слизистой оболочке пищевода более выражена, чем при изолированной патологии ($p < 0,05$).

Как изолированная ГЭРБ, так и сочетанная патология характеризуются повышением экспрессии ЦОГ-2 и CD16 в слизистой оболочке пищевода по сравнению с контролем ($p < 0,05$), при этом иммунореактивность исследуемых факторов более выражена при изолированной ГЭРБ ($p < 0,05$).

Изучение дополнительных регуляторных факторов, таких как апелин, и биомаркеров воспаления при ГЭРБ будет способствовать в перспективе идентификации механизмов, ведущих к функциональному нарушению защитной системы в пищеводе, определению развития осложнений заболевания и особенностей его коморбидного течения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ишемическая болезнь сердца и рефлюкс-эзофагит: сложности дифференциального диагноза и лечения больных / Ю. Н. Беленков, Е. В. Привалова, А. О. Юсупова, М. В. Кожевникова // РЖГГК. — 2011. — № 3. — С. 4–12.
2. Особливості морфофункціонального стану слизової оболонки стравоходу у хворих на гастроэзофагеальну рефлюксну хворобу / Г. Д. Фадеенко, В. Ю. Гальчінська, І. Е. Кушнір, О. Є. Гріднев // Сучасна гастроентерологія. — 2012. — № 5. — С. 13–20.
3. Проблема коморбидности с учетом состояния сердечно-сосудистой системы у пациентов с артериальной гипертензией и кислотозависимыми заболеваниями / О. В. Хлынова, А. В. Туев, Л. Н. Береснева, А. В. Агафонов // Казанский медицинский журнал. — 2013. — Т. 94, № 1. — С. 80–85.
4. Старцева М. С. Количественная оценка интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций с применением стандартных компьютерных программ / М. С. Старцева, В. М. Черток // Тихоокеанский журнал. — 2012. — № 1. — С. 121–123.
5. Фадеенко Г. Д. Эпидемиологические аспекты гастроэзофагеальной рефлюксной болезни / Г. Д. Фадеенко, И. Э. Кушнір, М. О. Бабак // Сучасна гастроентерологія. — 2008. — № 5. — С. 12–16.

6. Apelin/APJ signaling in hypoxia-related diseases / L. He, J. Xu, L. Chen, L. Li // *Clin. Chim. Acta.* — 2015. — Vol. 451 (Pt. B). — P. 191–198.
7. Apelin's effects on young rat gastrointestinal tract maturation / H. Antushevich, J. Bierła, B. Pawlina [et al.] // *Peptides.* — 2015. — Vol. 65. — P. 1–5.
8. *Bertrand C.* Apelin and energy metabolism / C. Bertrand, P. Valet, I. Castan-Laurell // *Frontiers in Physiology.* — 2015. — Vol. 6. — Article 115.
9. COX-2 induction by unconjugated bile acids involves reactive oxygen species-mediated signaling pathways in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma / S. Shumei, G. Sushovan, L. Kaifeng [et al.] // *Gut.* — 2007. — Vol. 56. — P. 1512–1521.
10. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma / H. R. Ferguson, C. P. Wild, L. A. Anderson, S. J. Murphy // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* — 2008. — Vol. 17 (3). — P. 727–731.
11. Immunologic response of the laryngeal mucosa to extraesophageal reflux / M. A. Birchall, M. Bailey, D. Gutowska-Owsiak [et al.] // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* — 2008. — Vol. 117, № 12. — P. 891–895.
12. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage / W. G. McMaster, A. Kirabo, M. S. Madhu, D. G. Harrison // *Circ. Res.* — 2015. — Vol. 116 (6). — P. 1022–1033.
13. Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract / G. Wang, R. Kundu, S. Han [et al.] // *Regul. Pept.* — 2009. — Vol. 158 (1–3). — P. 32–39.
14. *Soliman M.* Apelin protect against multiple organ injury following hemorrhagic shock and decrease the inflammatory response / M. Soliman, M. Arafah // *Int. J. Appl. Basic. Med. Res.* — 2015. — Vol. 5 (3). — P. 195–199.
15. *Wallace J. L.* Emerging roles for cyclooxygenase 2 in gastrointestinal mucosal defense / J. L. Wallace, P. R. Devchand // *Br. J. Pharmacol.* — 2005. — № 145 (3). — P. 275–287.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН ХМАПО ПЛАТНИХ ЦИКЛІВ СПЕЦІАЛІЗАЦІЇ Й УДОСКОНАЛЕННЯ ЛІКАРІВ НА 2016 РІК

КАФЕДРА НЕВРОЛОГІЇ ТА ДИТЯЧОЇ НЕВРОЛОГІЇ

Зав. кафедри проф. Т. А. Литовченко тел. 349-44-86

Клінічна та ультразвукова діагностика перинатальних уражень нервової системи (для дитячих неврологів, педіатрів, лікарів УЗД, неонатологів, акушерів-гінекологів, лікарів сімейної медицини) 08.09–07.10

КАФЕДРА ПСИХОТЕРАПІЇ

Зав. кафедри проф. Б. В. Михайлов тел. 343-41-44; 349-44-23

Психотерапія (для лікарів, які атестуються на II, I, вищу категорії) 13.09–12.10

Аналітично і неаналітично орієнтована групова психотерапія (для лікарів лікувального профілю) 15.11–14.12

КАФЕДРА РЕФЛЕКСОТЕРАПІЇ

Зав. кафедри проф. О. Г. Морозова тел. 725-06-21

Рефлексотерапія (для лікарів, які атестуються на II, I, вищу категорії) 07.11–06.12