



Анализ локальной экспрессии генов провоспалительных цитокинов у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и её взаимосвязи с количеством и типом гастроэзофагеальных рефлюксов

Морозов С. В.¹, Сенцова Т. Б.², Исаков В. А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 129110, Москва, Устьинский проезд, д. 2/14, Россия.

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1, Россия

Для цитирования: Морозов С. В., Сенцова Т. Б., Исаков В. А. Анализ локальной экспрессии генов провоспалительных цитокинов у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и её взаимосвязи с количеством и типом гастроэзофагеальных рефлюксов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;205(9): 65–73. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-205-9-65-73

✉ Для переписки:

Морозов

Сергей

Владимирович

torosoffsv@mail.ru

Морозов Сергей Владимирович, к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения гастроэнтерологии, гепатологии и диетотерапии

Сенцова Татьяна Борисовна, д.м.н., профессор кафедры госпитальной педиатрии № 2 педиатрического факультета

Исаков Василий Андреевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением гастроэнтерологии, гепатологии и диетотерапии

Резюме

Введение. Цель работы — изучить экспрессию генов провоспалительных цитокинов у больных с различными формами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) и провести анализ её взаимосвязи с показателями суточной пищевой рН-импедансометрии.

Материал и методы. Данные были получены в ходе проспективного одноцентрового исследования. Больным различными формами ГЭРБ в ходе эндоскопического исследования выполнялась биопсия слизистой оболочки нижней трети пищевода для анализа экспрессии генов интерлейкина 1b (IL-1b), 10 (IL-10), 18 (IL-18), фактора некроза опухоли альфа (TNFA), толл-подобного рецептора 4 (TLR4), транскрипционного фактора GATA3 (GATA3), кластера дифференцировки 68 (CD68), и бета-2 макроглобулина (B2M) (ДНК-Технология, Россия). Суточная пищеводная рН-импедансометрия проводилась при помощи аппарата Ohmega (MMS, Нидерланды), и зондов с 2 каналами рН и 6 каналами импеданса (Unisensor, США).

Результаты. Проведен анализ данных 60 человек (34 женщины, средний возраст 54,6±15,6 лет, наличие ЭЭ — у 20 человек). В группе ЭЭ, в сравнении с НЭРБ, были выше значения экспрессии генов IL-18 (5,89±0,4 в сравнении с 5,28±1,1, p=0,04) и GATA3 (2,92±0,86 в сравнении с 2,23±0,96, p=0,03), и индекса воспаления (92,12±32,41% в сравнении с 70,1±30,8%, p=0,02). Выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между временем экспозиции кислоты в пищеводе и экспрессией генов IL-1b (корреляционный коэффициент R по Спирмену 0,29), IL-18 (R=0,31), TNFA (R=0,35), GATA3 (R=0,34), TLR4 (R=0,29), CD68 (R=0,37) и индексом воспаления (R=0,3). Со средними значениями рН в нижней трети пищевода выявлена обратная зависимость экспрессии генов IL-18 (R= -0,28), TNFA (R= -0,33), GATA3 (R= -0,28), TLR4 (R= -0,28), CD68 (R= -0,39) и индекса воспаления (R= -0,17). Не выявлено взаимосвязи экспрессии изучаемых генов с количеством рефлюксов разного типа.

Выводы: Экспрессия генов провоспалительных цитокинов у больных ЭЭ и НЭРБ отличаются. Выявлена корреляционная взаимосвязь между экспрессией генов провоспалительных цитокинов и уровнем закисления нижней трети пищевода у больных ГЭРБ.

Ключевые слова: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь; ГЭРБ; интерлейкин; цитокины; экспрессия генов, пищеводная рН-импедансометрия, гастроэзофагеальный рефлюкс

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: WPOVKO



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-205-9-65-73>

Analysis of local expression of inflammatory cytokines genes in patients with gastroesophageal reflux disease and its association with types and number of gastroesophageal refluxes

S. V. Morozov¹, T. B. Sentsova², V. A. Isakov¹¹ Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, 10240, Ust'inskiy proezd, 2/14, Moscow, Russia² N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanov Str., 1, 117997, Moscow, Russia

For citation: Morozov S. V., Sentsova T. B., Isakov V. A. Analysis of local expression of inflammatory cytokines genes in patients with gastroesophageal reflux disease and its association with types and number of gastroesophageal refluxes. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;205(9): 65–73. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-205-9-65-73

✉ *Corresponding author:*

Sergey V. Morozov
morosoffsv@mail.ru

Sergey V. Morozov, MD, PhD, leading researcher of the Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition;
ORCID: 0000-0001-6816-3058, Scopus Author ID: 19836606400

Tatyana B. Sentsova, MD, PhD, Professor of the Department of Hospital Pediatrics No. 2 of the Pediatric Faculty;
ORCID: 0000-0002-3991-4702

Vasily A. Isakov, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition,
ORCID: 0000-0002-4417-8076

Summary

The aim of the study was to evaluate gene expression of proinflammatory cytokines in esophageal mucosa in patients with erosive esophagitis (EE) and non-erosive form (NERD) of gastroesophageal reflux disease (GERD) and perform correlation analysis between the genes expression and types and number of gastroesophageal refluxes.

Methods. This was a single-center prospective study. Esophageal mucosa samples were taken from lower part of the esophagus during endoscopy. Expression of IL-1b, IL-10, IL-18, TNFA, TLR4, GATA3, CD68 and beta-2 macroglobulin genes was assessed with ImmunoQuantex assays. Multichannel intraluminal esophageal pH-impedance studies were performed with Ohmega recorder and 2pH-6impedance catheters.

Results. Data of 60 patients (females — 34; mean age (M±SD) 54.6 years, 20 — with erosive esophagitis) were available for the analysis. In those with EE, there was higher expression of IL-18 (5.89±0.4 vs 5.28±1.1, p=0.04), GATA3 (2.92±0.86 vs 2.23±0.96, p=0.03) genes, and inflammatory index (92.12±32.41% vs 70.1±30.8%, p=0.02) compared to NERD. Direct correlation was found between acid exposure time and expression of IL-1b (Spearman rank R = 0.29), IL-18 (R=0.31), TNFA (R=0.35), GATA3 (R=0.34), TLR4 (R=0.29), CD68 (R=0.37) genes and inflammatory index (R=0.3). Indirect correlation was revealed between mean pH and expressions of IL-18 (R= -0.28), TNFA (R= -0.33), GATA3 (R= -0.28), TLR4 (R= -0.28), CD68 (R= -0.39) genes and inflammatory index (R= -0.17). No correlation was found between the genes' expression and number of gastroesophageal refluxes.

Conclusions: Expression of proinflammatory cytokines' genes differ in patients with EE and NERD. There is a correlation between expression of studied genes and esophageal acidity.

Keywords: gastroesophageal reflux; gastroesophageal reflux disease; GERD; interleukins, gene expression; multichannel intraluminal pH-impedance

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) — широко распространенное заболевание, со сложным патогенезом, характеризующееся нарушением моторики пищевода-желудочного перехода, развитием повторяющихся забросов содержимого желудка в пищевод, воздействием рефлюксата на слизистую оболочку пищевода с последующим развитием

спектра разнообразных симптомов и изменений, выявляемых при обследовании больного [1, 2]. Традиционно, все проявления ГЭРБ рассматривались в связи с тяжестью нарушений физиологии пищевода-желудочного перехода. Считалось, что чем больше нарушена функция нижнего пищевода сфинктера, тем более вероятно развитие

гастроэзофагеального рефлюкса, дольше экспозиция агрессивного содержимого желудка на слизистую оболочку пищевода, что приводит к более частому возникновению симптомов заболевания (отрыжка кислым, изжога, некоронарогенные боли за грудиной), и развитию более выраженных стадий эзофагита [3]. Однако, данные, полученные в последние годы, свидетельствуют о том, что взаимосвязь между тяжестью клинических проявлений заболевания и общепринятыми патофизиологическими механизмами не линейна: больные с неэрозивной формой ГЭРБ могут испытывать симптомы той же выраженности и с той же частотой, что и больные эрозивным эзофагитом, напротив, до 47% больных с эрозивным эзофагитом не испытывают типичные симптомы [4, 5]. Более того, демографические профили пациентов с различными проявлениями ГЭРБ отличаются: в то время как наличие тяжелых стадий эзофагита более характерно для мужчин старшего возраста европеоидной расы с наличием ожирения по абдоминальному типу, наличие симптомов заболевания в отсутствие повреждений слизистой оболочки более характерны для молодых женщин [6]. Результаты наблюдения за больными с наличием эзофагита в отсутствие проводимой терапии свидетельствуют о том, что тяжесть эндоскопических изменений остается стабильной с течением времени у большинства из них [7]. Все это позволяет выделять относительно стабильные формы заболевания – неэрозивная форма ГЭРБ (НЭРБ), рефлюкс-эзофагит (РЭ) и пищевод

Барретта, которые объединены общим патогенезом, но имеют различные патофизиологические особенности. К таким особенностям могут относиться генетические детерминанты, баланс факторов, отвечающих за поддержание местной воспалительной реакции слизистой оболочки пищевода и восприятия воздействия рефлюксата на рецепторный аппарат периферической и центральной нервной системы [8]. Ряд недавно опубликованных экспериментальных исследований позволяют предположить, что изменения слизистой оболочки пищевода вследствие воздействия агрессивных факторов, находящихся в желудочном соке возникают не вследствие ожога, как полагали ранее, а в результате индукции синтеза провоспалительных цитокинов, например, интерлейкинов (IL) 1 β и IL-8, что, в свою очередь, приводит к миграции в слизистую оболочку лимфоцитов и нейтрофилов [9–11]. Эти данные легли в основу теории «цитокинового щелчка», как основы патогенеза ГЭРБ [12]. Однако роль цитокинов у больных различными формами ГЭРБ изучена недостаточно, что обуславливает актуальность исследования в данном направлении.

Цель работы: изучить экспрессию генов провоспалительных цитокинов в слизистой оболочке пищевода у больных различными формами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и её взаимосвязи с количеством и типом гастроэзофагеальных рефлюксов, регистрируемых при помощи суточной пищевой рН-импедансометрии.

Материалы и методы

Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Материалом исследования послужили данные, полученные в ходе обследования больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью на базе отделения гастроэнтерологии, гепатологии и диетотерапии. В исследование включались больные гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью обоих полов, в возрасте от 18 до 80 лет, подписавшие форму информированного согласия до выполнения любых процедур, предусмотренных протоколом исследования, не принимающие ингибиторы протонного насоса или другие антисекреторные препараты как минимум за 2 недели до скрининга. Обязательным условием включения данных в конечный анализ являлось наличие результатов всех исследований, предусмотренных протоколом.

Критерии исключения: наличие оперативных вмешательств на органах брюшной и грудной полости

в анамнезе, имевшееся ранее или выявленное в результате обследования варикозное расширение вен желудка и пищевода, невозможность полноценного проведения хотя бы одного из инструментальных исследований, предусмотренных протоколом; общее состояние пациента, не позволявшее провести обследование в соответствии с протоколом исследования; прием лекарственных препаратов, которые могли привести к формированию клинических и эндоскопических проявлений, аналогичных таковым при ГЭРБ: прием нестероидных противовоспалительных препаратов, глюкокортикостероидов (за исключением средств для кожного применения, при условии, что указанные средства использовались в течение 2 недели или менее на момент включения в исследование), средств, влияющих на адренергические или ацетилхолиновые рецепторы, или обладающих местным раздражающим действием на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта.

Процедуры исследования

Верификация диагноза ГЭРБ. Верификация диагноза ГЭРБ проводилась в несколько этапов:

1. Оценка жалоб и анамнеза. На первом этапе оценивались клинические данные с наличием характерных для заболевания жалоб (отрыжка кислым, изжога минимум 1 раз в неделю), анамнеза (длительность заболевания не менее 6 месяцев, при этом симптомы должны оставаться актуальными в течение трех месяцев до включения в исследование). Предшествующий опыт приема ингибиторов протонного насоса с достижением купирования симптомов.
2. Использование специализированного вопросника. Обследуемым было предложено ответить на вопросы русскоязычной версии вопросника GERD-Q [13]. При этом диагноз ГЭРБ считался вероятным в том случае, если количество набранных баллов составляло 8 и более.

3. Оценка наличия патологического гастроэзофагеального рефлюкса и взаимосвязи имеющихся у пациентов симптомов. Критерии патологического гастроэзофагеального рефлюкса соответствовали Лионскому консенсусу [14].

Основными критериями диагноза ГЭРБ являлись данные жалоб и анамнеза, предшествующий опыт лечения ингибиторами протонного насоса с положительным результатом, и/или количество баллов по вопроснику GERD-Q 8 и более, а также наличие патологического гастроэзофагеального рефлюкса по данным суточной пищеводной рН-импедансометрии (доля времени рН менее 4 в пищеводе более 6% времени исследования, количество рефлюксов более 80 за сутки), или наличие взаимосвязи симптомов ГЭРБ и регистрируемых гастроэзофагеальных рефлюксов по данным расчета индекса симптомов и вероятности ассоциации симптомов с рефлюксом (в случаях, когда количество рефлюксов или длительность закисления нижней трети пищевода не соответствовало указанным выше).

Эндоскопическая оценка изменений слизистой оболочки пищевода проводилась при помощи панэндоскопа "Olympus Exera II CV-180". Описание стадий эрозивного эзофагита проводилось в соответствии с Лос-Анжелесской классификацией 1999г [3]. Больные ГЭРБ с наличием повреждений слизистой оболочки, соответствующих различной степени эзофагита согласно указанной классификации, были отнесены в группу с наличием эрозивного эзофагита (ЭЭ). В случае отсутствия соответствующих повреждений слизистой оболочки пациенты были распределены в группу неэрозивной формы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (НЭРБ).

Суточная пищеводная рН-импедансометрия проводилась с использованием рН-импеданс зондов с внутренним референсным электродом (2 канала рН, 6 каналов импеданс) (производства Unisensor AG, США) и рН-импеданс рекордера Omega (MMS, Голландия) с использованием прикладной программы производителя по стандартной методике. Установка зонда осуществлялась под контролем данных манометрии пищевода высокого разрешения, при этом пищеводный датчик рН располагался на 5 см выше верхней границы нижнего пищеводного сфинктера.

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии генов иммунной системы, вовлеченных в локальную воспалительную реакцию, проводился забор образцов ткани слизистой оболочки нижней трети пищевода стерильным зондом в ходе эндоскопического исследования.

Результаты

Конечному анализу оказались доступны данные 60 человек, из них 26 (43,3%) мужчин и 34 (56,7%) женщин. Доли больных мужского и женского пола достоверно не различались ($p=0,14$). Средний возраст пациентов составил $54,6 \pm 15,6$ лет. Эрозивный эзофагит по данным эндоскопического исследования выявлен у 20 (30%) обследуемых.

Результаты сравнения подгрупп больных с эрозивным эзофагитом и с неэрозивной формой ГЭРБ

Анализ уровня экспрессии генов осуществлялся по описанной ранее методике [15–16]. Биоматериал помещали в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, которые содержали 500 мкл среды для стабилизации РНК. Для выделения нуклеиновых кислот из материала использовали наборы «Проба НК» («НПО ДНК-Технология», Россия). Далее осуществляли постановку теста «ИммуноКвантэкс» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). В данной тест-системе после выделения суммарного пула ДНК и РНК проводится реакция обратной транскрипции для получения матрицы м-РНК, комплементарной ДНК, которая в дальнейшем амплифицируется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Реакцию обратной транскрипции (синтез кДНК на полученной РНК) проводили в объеме 40 мкл. В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды и обратную транскриптазу M-MuLV («Евроген», Россия). Уровень экспрессии оценивали методом сравнения пороговых циклов (метод $\Delta\Delta C_q$ с нормировкой на референсные гены (бета-2 макроглобулина)). Относительное значение экспрессии гена X вычислялось по формуле: $Expression(X) = 2^{-(C_p(x) - NF)}$. После этапа амплификации по показателю индикаторного цикла программно рассчитывали уровень экспрессии мРНК следующих генов: интерлейкина 1b (IL-1b), интерлейкина 10 (IL-10), интерлейкина 18 (IL-18), фактора некроза опухоли альфа (TNFA), толл-подобного рецептора 4 (TLR4), транскрипционного фактора GATA3 (GATA3), кластера дифференцировки 68 (CD68), и бета-2 макроглобулина (B2M). Расчет индекса воспаления, определяющий выраженность локальной воспалительной реакции на основании данных соотношения величин относительной экспрессии генов TNFA и IL-18, а также TLR4 и GATA3 производился по ранее описанной методике [17].

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи набора стандартных прикладных программ MS Excel 2016 (Microsoft, США) и программы Statistica 10 (StstSoft, США). Результаты представлены в виде средних величин и величины стандартного отклонения ($M \pm SD$). Полученные результаты анализировались при помощи модуля непараметрической статистики (U-критерий Манна-Уитни для сравнения выраженности различий между группами, корреляционный коэффициент R по Спирмену). Достоверными считались различия при $p < 0,05$. Дизайн исследования и схема распределения пациентов представлены на рисунке 1.

по демографическим данным, результатам суточной пищеводной рН-импедансометрии и оценке выраженности экспрессии генов провоспалительных цитокинов представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, в исследуемой группе больные неэрозивной формой ГЭРБ были старше, при этом достоверных отличий по соотношению количества лиц обоих полов в подгруппах не выявлено.

Рисунок 1. Дизайн исследования и схема распределения пациентов в группы.
Примечание: n – количество пациентов.
Figure 1. Study design and patients' flow and allocation chart



Таблица 1.

Сравнительный анализ подгрупп больных ГЭРБ с наличием и отсутствием эзофагита по демографическим данным, результатам суточной пищеводной рН-импедансометрии и выраженности экспрессии генов провоспалительных цитокинов.

Примечания:

N – количество пациентов в группе, n – количество; M – средние значения; SD – стандартное отклонение; log – выраженность экспрессии генов провоспалительных цитокинов представлена в десятичном логарифме. ИВ – индекс воспаления; ВЭК – время экспозиции кислоты в нижней трети пищевода (средние значения доли времени с pH < 4 за сутки); Высокие рефлюксы – доля гастроэзофагеальных рефлюксов, достигающих верхней трети пищевода (17 см выше пищеводно-желудочного перехода).

	ЭЭ, N=20	НЭРБ, N=40	P
Возраст, лет M±SD	47,5±13	58,2±15,8	0,007
Женщины,%	65	40	0,065
Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов			
IL-1b, log, M±SD	3,7±0,38	3,8±0,64	0,65
IL-10, log, M±SD	1,43±1,1	1,53±1,8	0,35
IL-18, log, M±SD	5,89±0,4	5,28±1,1	0,04
TNFA, log, M±SD	3,19±0,4	3,1±0,91	0,52
TLR4, log, M±SD	2,55±0,68	2,5±1,18	0,17
GATA3, log, M±SD	2,92±0,86	2,23±0,96	0,03
CD68, log, M±SD	4,9±0,55	5±1,06	0,13
B2M, log, M±SD	5,62±0,6	5,5±1,1	0,47
TNFA/IL18, M±SD	2,6±1,3	1,76±1,34	0,03
TLR4/GATA3, M±SD	0,005±0,008	0,006±0,007	0,67
ИВ,% M±SD	92,12±32,41	70,1±30,8	0,02
Анализ данных суточной пищеводной рН-импедансометрии			
Количество рефлюксов, n, M±SD	75,7±27,5	59,1±30,6	0,01
Кислые рефлюксы, n, M±SD	40,3±26,4	19,8±9,7	0,004
Слабокислые рефлюксы, n, M±SD	25,4±22,9	27±25,1	0,97
Некислые рефлюксы, n, M±SD	0,88±1,0	2,4±6,3	0,73
Высокие рефлюксы,% M±SD	46,5±21,7	38±21,4	0,28
ВЭК,% M±SD	12,1±3,7	9,1±4,8	0,001
Средние значения pH за сутки, M±SD	5,41±0,4	5,8±1,0	0,075

При анализе выраженности экспрессии генов провоспалительных цитокинов были выявлены достоверно более высокие уровни экспрессии генов IL-18 и GATA3 у больных эрозивным эзофагитом по сравнению с подгруппой больных неэрозивной формой ГЭРБ (таблица 1). Также у больных подгруппы ЭЭ были выявлены более высокие значения индекса локального воспаления слизистой оболочки пищевода.

Анализ данных, полученных при проведении суточной пищеводной рН-импедансометрии

выявил большее количество гастроэзофагеальных рефлюксов, регистрируемых за сутки в группе больных ЭЭ (таблица 1). Преимущественно, эти различия были обусловлены количеством кислых гастроэзофагеальных рефлюксов, которых также было больше у больных эрозивным эзофагитом. При этом достоверных различий между подгруппами больных ГЭРБ по количеству слабых рефлюксов и некислых рефлюксов, а также доли рефлюксов, достигающих верхней трети пищевода зарегистрировано не было. Несмотря на отсутствие

Таблица 2.

Значения корреляционных коэффициентов (R по Спирмену) при исследовании взаимосвязи между показателями суточной пищеводной рН-импедансометрии и экспрессией генов провоспалительных цитокинов.

Примечания:

ККР – количество кислых рефлюксов; КСР – количество слабокислых рефлюксов; КНР – количество не кислых рефлюксов; ВР – доля рефлюксов, достигающих верхней трети пищевода; рН ср – средние значения рН на уровне нижней трети пищевода; ВЭК – время экспозиции кислоты в нижней трети пищевода (средние значения доли времени с рН<4 за сутки); ИВ – индекс воспаления. * – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$.

	Количество рефлюксов	ККР	КСР	КНР	ВР	рН ср	ВЭК
IL-1b	-0,02	0,14	-0,11	0,04	-0,03	-0,24	0,29*
IL-10	-0,15	-0,02	-0,16	0,02	0,01	-0,21	0,18
IL-18	0,01	0,06	-0,02	0,01	0,01	-0,28*	0,31*
TNFA	-0,03	0,08	-0,12	0,01	-0,12	-0,33*	0,35*
GATA3	0,04	0,15	-0,13	-0,1	0,02	-0,28*	0,34*
TLR4	-0,05	0,04	-0,15	0,06	-0,04	-0,28*	0,29*
CD68	0,01	0,05	-0,03	-0,01	-0,08	-0,39*	0,37*
B2M	0,04	0,10	-0,04	0,17	0,09	-0,26	0,34*
ИВ	0,14	0,23	0,03	-0,12	0,14	-0,17*	0,30*

достоверных отличий по средним значениям рН, регистрируемых в нижней трети пищевода, время экспозиции кислоты было больше у больных эрозивной формой ГЭРБ.

Нами проведена попытка оценки взаимосвязи между выраженностью экспрессии генов провоспалительных цитокинов и показателями суточной пищеводной рН-импедансометрии. Результаты анализа с расчетом корреляционного коэффициента R по Спирмену представлены в таблице 2. Как общее количество гастроэзофагеальных рефлюксов, так и их подтипы (кислые, слабокислые,

некислые), достоверно не были связаны с экспрессией генов провоспалительных цитокинов. В то же время, была зарегистрирована прямая достоверная взаимосвязь между долей времени с рН менее 4 на уровне нижней трети пищевода (ВЭК) и экспрессией генов IL-1B, IL-18, TNFA, TLR4, CD68 и B2M, а также интегральным индексом локального воспаления (ИВ). Обратная достоверная зависимость была выявлена в отношении экспрессии генов IL-18, TNFA, GATA3, TLR4, CD68 и индекса воспаления со средними значениями рН в нижней трети пищевода.

Обсуждение

В статье представлены результаты пилотного исследования экспрессии генов провоспалительных цитокинов в слизистой оболочке пищевода у больных различными формами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и анализ взаимосвязи показателей локального иммунного ответа с результатами суточной пищеводной рН-импедансометрии. Разная выраженность локальной экспрессии генов провоспалительных цитокинов у больных различными формами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и наличие корреляционной её взаимосвязи с уровнем закисления пищевода могут свидетельствовать о том, что генетические особенности играют важную роль в формировании различных форм заболевания. Формирование эрозий и язв слизистой оболочки пищевода может быть обусловлено не столько самими физико-химическими свойствами рефлюксата, сколько различными уровнями активации экспрессии генов, отвечающих за локальное воспаление. Последние могут зависеть от выраженности воздействия агрессивного фактора, что подтверждается данными корреляционного анализа. С другой стороны, уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов может быть генетически детерминирован, и это могло бы объяснить те факты, что при одном и том же уровне закисления пищевода у части больных слизистая оболочка остается интактной, а у другой – формируются повреждения различной выраженности.

Несмотря на то, что различия в цитокиновом профиле больных различными формами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни были

продемонстрированы в ряде работ, в них преимущественно оценивались данные системной воспалительной реакции, на основании концентрации цитокинов в сыворотке крови [18]. Недостатком такого подхода может являться зависимость получаемых данных от воспалительного процесса в других органах. В нескольких работах также были выявлены отличия по уровням таких цитокинов как интерлейкин 8, интерлейкин 4 и интерферон гамма у больных эрозивным эзофагитом и неэрозивной формой ГЭРБ, свидетельствующие о более высоких концентрациях провоспалительных маркеров у больных с наличием повреждений слизистой оболочки пищевода [19–21]. Однако различия в экспрессии генов, в том числе интерлейкина 10 (IL-10), интерлейкина 18 (IL-18), толл-подобного рецептора 4 (TLR4), транскрипционного фактора GATA3 (GATA3), кластера дифференцировки 68 (CD68) у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью ранее не изучались.

В доступной литературе не выявлено работ, в которых бы проводился корреляционный анализ выраженности экспрессии генов провоспалительных цитокинов с показателями суточной пищеводной рН-импедансометрии. В единственном выявленном нами исследовании с похожим дизайном, в котором оценивалась относительная экспрессия генов провоспалительных цитокинов (IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) в биоптатах слизистой оболочки у больных ГЭРБ и представителей контрольной группы было показано, что аномальное закисление нижней трети пищевода (время

экспозиции кислоты в нижней трети пищевода за сутки более 4,2%) сопровождалось достоверным повышением экспрессии генов IL-1B, IL-6 и TNFA [22]. К сожалению, недостатком указанного исследования, затрудняющим интерпретацию результатов, являлось отсутствие данных импедансометрии пищевода, отличие критериев патологического уровня экспозиции кислоты в пищеводе от общепринятых в настоящее время значений, а также то, что диагноз гастроэзофагеальной рефлюксной болезни основывался только на симптомах и данных эндоскопического исследования. Наши результаты частично подтверждают и дополняют данные, полученные авторами цитируемой работы: корреляционный анализ, не выявил взаимосвязи экспрессии гена IL-10 с временем экспозиции кислоты, подтверждена прямая взаимосвязь ВЭК с экспрессией генов IL-1B и TNFA, получены новые данные о наличии прямой зависимости ВЭК с экспрессией генов GATA3, TLR4, CD68 и интегрального показателя локальной воспалительной реакции (индекс воспаления). Насколько нам известно, обратная взаимосвязь экспрессии генов IL-18, TNFA, GATA3, TLR4, CD68 и ИВ в слизистой оболочке пищевода у больных ГЭРБ со средними значениями pH в нижней трети пищевода продемонстрирована впервые.

Полученные результаты могут быть важны как с научной, так и с практической точки зрения. Действительно, формирование различных форм гастроэзофагеальной рефлюксной болезни достаточно сложно объяснить лишь различиями в выраженности и агрессивности воздействия кислотно-пептической атаки на слизистую оболочку пищевода [23]. У больных с неэрозивной формой гастроэзофагеальной рефлюксной болезни могут наблюдаться аналогичные уровни закисления пищевода, что и у больных эрозивным эзофагитом. Это частично продемонстрировано и в нашем исследовании: средние значения pH в нижней трети пищевода в исследуемых группах достоверно не отличались. В то же время, генетические особенности, определяющие локальный воспалительный ответ на повреждающее воздействие может обусловить формирование различных фенотипических проявлений у больных ГЭРБ. Повышенная экспрессия генов провоспалительных цитокинов обуславливает более высокие локальные концентрации самих цитокинов и запускает последующий каскад соответствующих реакций, повреждающих целостность слизистой. Например, было показано, что IL-1B может влиять на полиморфноядерные лейкоциты активируя их активность, усиливая адгезию, хемотаксис, фагоцитоз, продукцию свободных форм кислорода [24–25]. Интерлейкин 18 может повышать цитотоксичность Т-клеток и натуральных киллеров, а также стимулирует продукцию других цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа и IL-1B, а также ответствен за повышение продукции интерферона-гамма [26]. Кластер дифференцировки 68 (CD68) играет роль в фагоцитарной активности тканевых макрофагов, позволяя им прикрепляться в определенном участке ткани [27]. В целом, воздействие этих факторов может приводить к формированию

повреждения тканей слизистой оболочки в виде эрозий и язв. Фактор некроза опухоли альфа является одним из основных провоспалительных цитокинов, стимулирует апоптоз, обеспечивает повышенную продукцию белков острой фазы воспаления, является хемоаттрактантом макрофагов и клеток Лангерганса, стимулятором ангиогенеза, потенциальным активатором моноцитов, а также фагоцитоза и продукции свободных радикалов [28, 29]. В совокупности с IL-10 и GATA3, TNFA может оказывать стимулирующее влияние на секрецию Ig E, а также миграцию эозинофилов, что особенно интересно с точки зрения дифференциальной диагностики [30–31]. Действительно, ряд пациентов с эозинофильным эзофагитом хорошо отвечают на лечение ингибиторами протонного насоса [32]. Этот эффект можно объяснить развитием эозинофильного воспаления пищевода в ответ на избыточную экспрессию указанных цитокинов вследствие гастроэзофагеального рефлюкса.

Ограничением нашей работы явилось небольшое количество участников исследования, данные которых были доступны конечному анализу. Однако частично этот недостаток компенсировался тщательным отбором пациентов, что сводило к минимуму вероятность включения больных с неподтвержденным диагнозом гастроэзофагеальной рефлюксной болезни.

Следует отметить, что нами не проводилось деление подгрупп в зависимости от тяжести повреждений слизистой оболочки в связи с небольшим количеством участников этой группы. Кроме того, отдельно не анализировались данные больных с гиперчувствительным пищеводом (последние были включены в подгруппу больных неэрозивной формой ГЭРБ). Выделение указанных подгрупп могло бы помочь получить более дифференцированные данные, однако использование большего количества групп с меньшей выборкой существенно повысило бы шансы на получения статистической ошибки второго рода.

Особенностью дизайна работы явилось отсутствие контрольной группы, что в определенной степени было связано с этическими аспектами проведения исследования, в частности, необходимости выполнения ряда инвазивных исследований пациентам без наличия патологии. Однако использование корреляционного анализа взаимосвязи показателей локальной воспалительной реакции с данными суточной пищевой pH-импедансометрии частично компенсировало этот недостаток. Хотелось бы подчеркнуть, что наличие корреляции не позволяет сделать однозначный вывод о направленности влияния уровней закисления пищевода и выраженности экспрессии генов провоспалительных цитокинов, поскольку выявленная зависимость может быть обусловлена действием третьего фактора, влияющего как на показатели закисления, так и на экспрессию генов. Выявленные в ходе настоящей работы особенности экспрессии генов провоспалительных цитокинов в слизистой оболочке пищевода у больных различными формами гастроэзофагеальной рефлюксной болезни требуют дальнейшего изучения в специально спланированных исследованиях.

Выводы

У больных эрозивным эзофагитом наблюдается более высокие значения экспрессии генов интерлейкина 18, транскрипционного фактора GATA3, и интегрального индекса локального воспаления (ИВ) в сравнении с больными неэрозивной формой гастроэзофагеальной рефлюксной болезни.

Выявлена прямая достоверная корреляционная зависимость экспрессии генов IL-1B, IL-18, TNFA, TLR4, CD68 и B2M, а также интегральным индексом локального воспаления (ИВ) в слизистой оболочке пищевода с временем экспозиции кислоты в нижней трети пищевода и обратная корреляционная зависимость экспрессии генов IL-18, TNFA, GATA3, TLR4, CD68 и ИВ со средними значениями

pH в нижней трети пищевода у больных ГЭРБ. Это может свидетельствовать об участии генетических механизмов в формировании различных фенотипов ГЭРБ.

Корреляционной зависимости экспрессии генов провоспалительных цитокинов в слизистой оболочке пищевода с общим количеством гастроэзофагеальных рефлюксов, а также кислых, слабокислых и не кислых рефлюксов выявлено не было.

Требуются дальнейшие исследования роли экспрессии генов провоспалительных цитокинов в патогенезе различных форм гастроэзофагеальной рефлюксной болезни.

Информация о финансовой поддержке работы: Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания на выполнение научных исследований ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» с финансированием за счет средств, выделяемых Министерством науки и высшего образования РФ (<https://rosid.ru:AAAA-A20-120100990076-9>).

This work was performed with financial support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, registered at <https://rosid.ru:AAAA-A20-120100990076-9>.

Благодарность/Acknowledgments. Авторы работы выражают благодарность пациентам, принявшим участие в исследовании, а также Андрею Евгеньевичу Донникову (ООО НПО «ДНК-Технология») за помощь с выполнением генетических исследований.

The authors acknowledge and thank participants of the study. The authors thank Andrey Donnikov (DNK-Technologiya) for his help with genetic testing.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Морозов, Сенцова

Сбор и обработка материала – Морозов

Статистическая обработка – Морозов

Написание текста – Морозов

Редактирование – Морозов, Сенцова, Исаков.

Оба автора согласовали окончательную редакцию рукописи.

Authors' contribution:

Sergey Morozov (SM) and Tatyana Sentsova (TS) designed the study;

SM collected and analyzed data;

SM performed statistical analysis and drafted the manuscript,

all authors approve the final version of the manuscript.

Литература | References

- Ivashkin V.T., Maev I.V., Trukhmanov A.S., et al. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association in Diagnosis and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2020;30(4):70–97. (In Russ.) doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-4-70-97
Ивашкин В. Т., Маев И. В., Трухманов А. С., и др. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2020;30(4):70–97. doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-4-70-97
- Vakil N. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(8):1900–1920.
- Lundell L.R., Dent J., Bennett J.R., et al. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut*. 1999;45(2):172–80. doi: 10.1136/gut.45.2.172
- Kasyap A. K., Sah S. K., Chaudhary S. Clinical spectrum and risk factors associated with asymptomatic erosive esophagitis as determined by Los Angeles classification: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2018;13(2): e0192739
- Knowles C. H., Aziz Q. Visceral hypersensitivity in non-erosive reflux disease. *Gut*. 2008;57(5):674–683.
- Savarino E., Tutuian R., Zentilin P., et al. Characteristics of reflux episodes and symptom association in patients with erosive esophagitis and nonerosive reflux disease: study using combined impedance-pH off therapy. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(5):1053–1061.
- Ronkainen J., Talley N. J., Storskrubb T., et al. Erosive esophagitis is a risk factor for Barrett's esophagus: a community-based endoscopic follow-up study. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(11):1946–1952.
- Katzka D. A., Pandolfino J. E., Kahrilas P. J. Phenotypes of Gastroesophageal Reflux Disease: Where Rome, Lyon, and Montreal Meet. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2020;18:767–776. doi: 10.1016/j.cgh.2019.07.015

9. Yamaguchi T., Yoshida N., Tomatsuri N., et al. Cytokine-induced neutrophil accumulation in the pathogenesis of acute reflux esophagitis in rats. *Int J Mol Med.* 2005;16(1):71–77.
10. Hamaguchi M., Fujiwara Y., Takashima T., et al. Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion.* 2003;68(4):189–197.
11. Isomoto H., Saenko V. A., Kanazawa Y., et al. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(4):589–597.
12. Souza R. F., Huo X., Mittal V., et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1776–1784.
13. Morozov S. V. GERD-Q questionnaire – a novel tool for gastroesophageal reflux disease diagnosis. *Akademicheskij Zhurnal Zapadnoj Sibiri.* 2014; 3 (52): 26–28. (In Russ.)
Морозов С. В. Опросник GERD-Q – новый инструмент диагностики гастроэзофагеальной рефлюксной болезни для врача общей практики. Академический журнал Западной Сибири. 2014; 3 (52): 26–28.
14. Roman S., Gyawali C. P., Savarino E., Yadlapati R., Zerbib F., Wu J., Vela M., Tutuian R., Tatum R., Sifrim D., Keller J., Fox M., Pandolfino J. E., Bredenoord A. J.; GERD consensus group. Ambulatory reflux monitoring for diagnosis of gastro-esophageal reflux disease: Update of the Porto consensus and recommendations from an international consensus group. *Neurogastroenterol Motil.* 2017;29(10):1–15. doi: 10.1111/nmo.13067.
15. Kozlov I. B., Vatazin A. V., Kildushevsky A. V., et al. Analysis of expression of immune system genes that are responsible for activation and inhibition of T-cell immune response in renal transplant recipients after extracorporeal photochemotherapy. *Immunologiya.* 2020; 41 (1): 20–30. (in Russ.) doi: 10.33029/0206–4952–2020–41–1–20–30
Козлов И. Б., Ватазин А. В., Кильдюшевский А. В., и др. Анализ экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного иммунного ответа, у реципиентов почечного трансплантата после ЭКФ. Иммунология. 2020; 41 (1): 20–30. doi: 10.33029/0206–4952–2020–41–1–20–30
16. Katkova N. Yu., Bodrikova O. I., Sergeeva A. V., Bezrukova I. M., Pokusaeva K. B. The local immune profile of the woman and different scenarios of preterm delivery. *Bulletin of RSMU.* 2017; (3): 53–7. (in Russ.) doi: 10.24075/brsmu.2017–03–07
Каткова Н. Ю., Бодрикова О. И., Сергеева А. В., Безрукова И. М., Покусаева К. Б. Состояние локального иммунного статуса при различных вариантах преждевременных родов. Вестник РГМУ. 2017;3:57–62. doi: 10.24075/brsmu.2017–03–07
17. <https://patenton.ru/patent/RU2552310C2> World Wide Web document. Accessed 05.11.2021.
18. Yevsyutina Yu. V., Trukhmanov A. S., Ivashkin V. T., Lyamina S. V., Malyshev I. Yu. Systemic immune response at gastroesophageal reflux disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2015; 25(5):32–38. (in Russ.)
Евсютина Ю. В., Трухманов А. С., Ивашкин В. Т., Лямина С. В., Малышев И. Ю. Системный иммунный ответ у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью. РЖГТК. 2015; 5:32–38.
19. Isomoto H., Inoue K., Kohno S. Interleukin-8 levels in esophageal mucosa and long-term clinical outcome of patients with reflux esophagitis. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42(3):410–411. doi:10.1080/00365520600931469
20. Zhong Y. Q., Lin Y., Xu Z. Expression of IFN- γ and IL-4 in the esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus and their relationship with endoscopic and histologic grading. *Dig Dis Sci.* 2011;56(10):2865–2870. doi:10.1007/s10620–011–1696–9
21. Mönkemüller K., Wex T., Kuester D., et al. Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease. *Digestion.* 2009;79(3):186–195. doi:10.1159/000211714
22. Zavala-Solares M. R., Fonseca-Camarillo G., Valdovinos M., et al. Gene expression profiling of inflammatory cytokines in esophageal biopsies of different phenotypes of gastroesophageal reflux disease: a cross-sectional study. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):201. Published 2021 May 3. doi:10.1186/s12876–021–01707–7
23. Wang C., Hunt R. H. Precise role of acid in non-erosive reflux disease. *Digestion.* 2008;78 Suppl 1:31–41. doi:10.1159/000151253
24. Belova O. V., Arion V. O., Sergienko V. I. The role of cytokines in immunological function of skin. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2008; 1: 41–55. (in Russ.)
Белова О. В., Арион В. О., Сергиенко В. И. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008; 1: 41–55.
25. Christodoulou C., Choy E. H. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* 2006;6(1):13–19. doi:10.1007/s10238–006–0088–5
26. Glotov A. V., Potudanskaya M. G., ed. Fundamentals of Immunology, Immunogenetics and Immunobiotechnology: Textbook. Omsk: Omsk State Univ.: 2009. (in Russ.)
Глотов А. В., Потуданская М. Г., ред. Основы иммунологии, иммуногенетики и иммунобиотехнологии. Учеб. пособие. Омск: Омский гос. ун-т; 2009. 119 с.
27. Chistiakov D. A., Killingsworth M. C., Myasoedova V. A., Orekhov A. N., Bobryshev Y. V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017;97(1):4–13. doi:10.1038/labinvest.2016.116
28. Stashkevich D. S., Filippova Yu. Yu., Burmistrova A. L., ed. Actual matters of immunology: system of cytokines, biological value, genetic polymorphism, methods of detection: Textbook. Chelyabinsk: Tsitsero; 2016. (in Russ.)
Сташкевич Д. С., Филиппова Ю. Ю., Бурмистрова А. Л., ред. Актуальные вопросы иммунологии: система цитокинов, биологическое значение, генетический полиморфизм, методы определения. Учебное пособие. Челябинск: Цицеро; 2016. 82 с.
29. Hamaguchi M., Fujiwara Y., Takashima T., et al. Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion.* 2003;68(4):189–197. doi:10.1159/000075698
30. Barnes P. J. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(7):454–466. doi:10.1038/s41577–018–0006–6
31. Bachert C., Zhang L., Gevaert P. Current and future treatment options for adult chronic rhinosinusitis: Focus on nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(6):1431–1440. doi:10.1016/j.jaci.2015.10.010
32. Molina-Infante J., Gonzalez-Cordero P. L., Lucendo A. J. Proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: still a valid diagnosis? *Curr Opin Gastroenterol.* 2017 Jul;33(4):285–292. doi: 10.1097/MOG.0000000000000371.