



Особенности экспрессии рецепторов мелатонина второго типа эпителиоцитами пищевода при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни

О.А. Карпович^{1,*}, Т.Т. Штабинская¹, В.И. Шишко¹, Я.А. Колодзейский²

¹ УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Республика Беларусь

² УЗ «Городская клиническая больница № 2 г. Гродно», Гродно, Республика Беларусь

Цель исследования. Изучить особенности экспрессии рецепторов мелатонина второго типа (MTNR1B) эпителиоцитами дистального отдела пищевода при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) в зависимости от степени тяжести эндоскопических изменений слизистой оболочки.

Материалы и методы. В исследование включены 48 пациентов с ГЭРБ, из них 37 человек с неэрозивной рефлюксной болезнью (НЭРБ) и 11 — с эрозивной рефлюксной болезнью (ЭРБ). Группу сравнения составили 18 пациентов без ГЭРБ, сопоставимые с основными группами по полу, возрасту и индексу массы тела. Выполнена эзофагогастродуоденоскопия с забором биопсийного материала из слизистой оболочки дистального отдела пищевода с целью определения экспрессии MTNR1B. Количественная оценка интенсивности экспрессии MTNR1B проводилась при помощи компьютерной программы Aperio ImageScope_v9.1.19.1567. Определяли уровень метаболита мелатонина: 6-сульфатоксимелатонина (6-COMT) в суточной моче и раздельно в дневной и ночной ее порциях.

Результаты. Интенсивность экспрессии MTNR1B эпителиоцитами пищевода у пациентов с НЭРБ не отличалась от таковой у пациентов группы сравнения (0,436 (0,123; 0,668) и 0,437 (0,202; 0,692) соответственно; $p > 0,05$). Отмечено достоверное снижение экспрессии рецепторов MTNR1B у пациентов с ЭРБ по сравнению с пациентами с НЭРБ (0,127 (0,059; 0,156) и 0,436 (0,123; 0,668) соответственно; $p = 0,017$) и пациентами группы сравнения (0,437 (0,202; 0,692); $p = 0,033$). Низкая интенсивность экспрессии MTNR1B была ассоциирована с более выраженными эндоскопическими изменениями слизистой оболочки пищевода ($r = -0,40$; $p = 0,0015$). Выявлена статистически достоверная связь интенсивности экспрессии MTNR1B с уровнем мелатонина в дневные часы ($r = 0,42$; $p = 0,018$), а также индексом ночь/день, отражающим суточную ритмику синтеза мелатонина ($r = -0,43$; $p = 0,016$).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение интенсивности экспрессии MTNR1B эпителиоцитами пищевода является прогностически неблагоприятным признаком течения ГЭРБ: низкая интенсивность экспрессии MTNR1B ассоциирована с более тяжелой (эрозивной) формой ГЭРБ и более выраженными эндоскопическими изменениями слизистой оболочки пищевода.

Ключевые слова: мелатонин, рецепторы мелатонина, MTNR1B, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, рефлюкс-эзофагит, неэрозивная рефлюксная болезнь, эрозивная рефлюксная болезнь

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Карпович О. А., Штабинская Т. Т., Шишко В. И., Колодзейский Я. А. Особенности экспрессии рецепторов мелатонина второго типа эпителиоцитами пищевода при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2020;30(2):26–34. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2020-30-2-26-34>

Features of the Expression of Second-Type Melatonin Receptors by Esophagus Epitheliocytes in Gastroesophageal Reflux Disease

Olesya A. Karpovich^{1,*}, Tatyana T. Shtabinskaya¹, Vitaliy I. Shishko¹, Yaroslav A. Kolodzeysky²

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

² Grodno City Clinical Hospital No. 2, Grodno, Republic of Belarus

Aim. To investigate the specific features of the expression of second-type melatonin receptors (MTNR1B) by epithelial cells of the distal esophagus in gastroesophageal reflux disease (GERD), depending on the severity of endoscopic changes in the mucous membrane.

Materials and methods. The study included 48 GERD patients, out of whom 37 and 11 people were suffering from non-erosive reflux disease (NERD) and erosive reflux disease (ERD), respectively. The control group consisted of

18 patients without GERD, comparable with the main groups by gender, age and body mass index. In order to determine the expression of MTNR1B, esophagogastroduodenoscopy with the collection of biopsy material from the mucous membrane of the distal esophagus was performed. The quantification of the MTNR1B expression intensity was carried out using the Aperio ImageScope_v9.1.19.1567 software. The level of melatonin metabolite, 6-sulphate-hydroxymelatonin (6-SOMT), was determined in daily urine, as well as separately in daytime and nighttime portions.

Results. The intensity of MTNR1B expression by esophageal epithelial cells in patients with NERD demonstrated no difference with the control group (0.436 (0.123, 0.668) and 0.437 (0.202, 0.692), respectively; $p > 0.05$). A significant decrease in the expression of MTNR1B receptors was noted in patients with ERD compared to NERD patients (0.127 (0.059, 0.156) and 0.436 (0.123, 0.668), respectively; $p = 0.017$) and patients in the control group (0.437 (0.202, 0.692); $p = 0.033$). The low intensity of MTNR1B expression was associated with more pronounced endoscopic changes in the mucous membrane of the esophagus ($r = -0.40$; $p = 0.0015$). A statistically significant relationship was found between the expression intensity of MTNR1B and the level of melatonin in the daytime ($r = 0.42$; $p = 0.018$), as well as the night/day index reflecting the daily rhythm of melatonin synthesis ($r = -0.43$; $p = 0.016$).

Conclusions. The obtained data indicate that a decrease in the intensity of MTNR1B expression by esophageal epithelial cells can be considered as a prognostically unfavourable sign of the GERD course. The low intensity of MTNR1B expression is associated with a more severe (erosive) form of GERD and more pronounced endoscopic changes in the mucous membrane of the esophagus.

Keywords: melatonin, melatonin receptors, MTNR1B, gastroesophageal reflux disease, reflux esophagitis, non-erosive reflux disease, erosive reflux disease

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For citation: Karpovich O.A., Shtabinskaya T.T., Shishko V.I., Kolodzeysky Ya.A. Features of the Expression of Second-Type Melatonin Receptors by Esophagus Epitheliocytes in Gastroesophageal Reflux Disease. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2020;30(2):26–34. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2020-30-2-26-34>

Введение

В течение длительного времени традиционная концепция повреждения слизистой оболочки пищевода (СОП) при рефлюкс-эзофагите (РЭ) заключалась в том, что РЭ возникает в результате агрессивного воздействия на эпителиальные клетки таких компонентов рефлюктата, как соляная кислота, пепсин, желчные кислоты и др. Считается, что соляная кислота и пепсин повреждают межклеточные контакты эпителиоцитов, делая эпителий проницаемым и позволяя проникать компонентам рефлюктата в более глубокие слои СОП, вызывая гибель эпителиоцитов. Также предполагается, что гибель клеток поверхностного слоя плоского эпителия пищевода вызывает компенсаторную пролиферативную реакцию в виде базальноклеточной и папиллярной гиперплазии, которая направлена на восстановление поврежденного эпителия [1]. Основываясь на этой модели развития РЭ, разработана современная стратегия лечения ГЭРБ, направленная на предотвращение кислотного повреждения СОП с помощью ингибиторов протонной помпы (ИПП). Однако, несмотря на достижения последних лет в диагностике и лечении ГЭРБ, сохраняется проблема резистентности к ИПП. Известно, что общая частота случаев клинической неэффективности терапии ГЭРБ на фоне приема стандартных доз ИПП составляет 10–40 % [2]. При этом длительное течение РЭ при отсутствии адекватного лечения может приводить к развитию серьезных осложнений, включая стриктуры пищевода, пищевод Барретта и аденокарциному пищевода [3, 4]. Таким образом, весьма актуальными становятся исследования, направленные на изучение механизмов повреждения СОП при ГЭРБ и по-

иск новых терапевтических мишеней при лечении РЭ, что позволит предотвратить прогрессирование заболевания и избежать его осложнений.

Исследования последних лет убедительно показывают важную роль мелатонина в поддержании целостности желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и защите пищевода от повреждающего действия рефлюктата при ГЭРБ [5]. Защитное действие мелатонина в ЖКТ реализуется через его взаимодействие со специфическими рецепторами второго типа (MTNR1B) [6]. В то же время работ, посвященных изучению особенностей экспрессии MTNR1B в СОП, нами не найдено. В связи с этим было проведено одномоментное поперечное сравнительное исследование, целью которого явилось изучение экспрессии рецепторов MTNR1B эпителиоцитами дистального отдела пищевода при ГЭРБ и связи интенсивности их экспрессии с тяжестью эндоскопических изменений СОП при РЭ.

Материал и методы

Исследование было одобрено Комитетом по биоэтической этике УО «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 1 от 11.01.2017). В исследование были включены 66 пациентов в возрасте 30–60 лет, находившихся на лечении в кардиологическом и терапевтическом отделениях УЗ «ГКБ № 2 г. Гродно» в период с 2017 по 2019 г. Выборка была сформирована согласно критериям включения и невключения. Средний возраст обследуемых составил $46,8 \pm 10,3$ года. Мужчин 47 (71,2 %), женщин 19 (28,8 %).

Критерием включения в исследование явилось наличие у пациентов, подписавших добровольное информированное согласие на участие

в исследовании, сочетания типичных для ГЭРБ жалоб (изжога, кислая/горькая отрыжка и регургитация) и визуально различимого при эндоскопическом исследовании РЭ.

Критерии исключения/невключения: заболевания пищевода нерефлюксной этиологии, язва желудка и ДПК в стадии обострения, состояния после операций на пищеводе и желудке, злокачественные новообразования любой локализации и стадии, а также заболевания и состояния, которые могли бы исказить уровни и циркадный ритм мелатонина, повлиять на его распад и выделение с мочой, прием снотворных, антидепрессантов и препаратов, содержащих мелатонин.

Диагноз ГЭРБ выставлялся согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения», утвержденного 01.06.2017 постановлением № 54 Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Исследования выполнялись перед началом лечения.

Всем пациентам была проведена эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) эндоскопом GIF V70 (Olympus, Япония). Неэрозивную ГЭРБ диагностировали при наличии макроскопических признаков катарального рефлюкс-эзофагита и отсутствии отчетливых повреждений слизистой оболочки пищевода в виде эрозий и язв. При детализации эрозивных изменений пищевода использовали Лос-Анджелесскую классификацию (модификация 1999 г.). Для оценки степени макроскопических изменений СОП использовали систему баллов от 0 до 3: 0 баллов — нормальная слизистая пищевода, 1 балл — гиперемизированная или отечная слизистая с единичными очаговыми геморрагиями, 2 балла — одна или несколько эрозий длиной не более 5 мм, 3 балла — одна или несколько эрозий длиной более 5 мм.

На основании результатов ЭГДС были сформированы исследуемые группы: группа 1 ($n = 37$) — пациенты с НЭРБ, группа 2 ($n = 11$) — пациенты с ЭРБ, группа 3 ($n = 18$) — пациенты без ГЭРБ (группа сравнения).

Материал для гистологического исследования прицельно забирали при ЭГДС из участков максимальной выраженности структурных изменений слизистой дистального отдела пищевода. При отсутствии макроскопических изменений слизистой оболочки биопсия выполнялась из нижней трети пищевода на 3 см выше условной циркулярной линии, соединяющей проксимальные концы складок желудка. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводилось на парафиновых срезах толщиной 4 мкм с использованием Melatonin receptor 1B antibody в разведении 1:100 (Novus Biologicals, USA). Фотографии микропрепаратов были получены с использованием объектива $\times 20$ с разрешением 1600×1200 пикселей, при помощи микроскопа Leica и цифровой камеры Leica 425C. Положительным результатом считалось специфическое окрашивание образцов тканей в коричневый цвет. Подсчи-

тывалось количество позитивно окрашенных клеток к общему количеству клеток на оцениваемых участках (показатель «позитивность» в интерфейсе программы Aperio ImageScope_v9.1.19.1567). Интенсивность экспрессии оценивали по балльной системе (от 1 до 5 баллов): 1 балл (очень низкая экспрессия) — процент позитивно окрашенных клеток от 0 до 20 % (значение показателя «позитивность» $\leq 0,20$), 2 балла (низкая экспрессия) — от 21 до 40 % («позитивность» 0,21–0,40), 3 балла (умеренная экспрессия) — от 41 до 60 % («позитивность» 0,41–0,60), 4 балла (высокая экспрессия) — от 61 до 80 % («позитивность» 0,61–0,8) и 5 баллов (очень высокая экспрессия) — от 81 до 100 % («позитивность» 0,81–1,0).

Уровень мелатонина оценивали по содержанию его метаболита: 6-сульфатоксимелатонина (6-COMT) в суточной моче и отдельно в дневной и ночной порциях методом иммуноферментного анализа на иммуноферментном анализаторе Sunrise TECAN с помощью набора для иммуноферментного анализа Human MS (Melatonin Sulfate) ELISA KitCat № EH3383. Рассчитывался индекс ночь/день, который характеризует суточную ритмику продукции мелатонина.

Статистический анализ материала проводился с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). С учетом несоответствия большинства выборок критериям нормального распределения при анализе данных использовались методы непараметрической статистики. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и интерквартильного размаха (25%; 75%). При сравнении количественных показателей между четырьмя независимыми выборками использовался критерий Краскела — Уоллиса (H). С целью изучения связи между явлениями рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

По результатам эндоскопического исследования в большинстве случаев (37 (77,1 %; 95 % ДИ: 63,3–86,9 %) человек) диагностировался катаральный эзофагит (неэрозивная ГЭРБ, НЭРБ), у остальных пациентов (11 (22,9 %; 95 % ДИ: 13,2–36,7 %) человек) определялся эрозивный эзофагит (эрозивная ГЭРБ, ЭРБ). Исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и антропометрическим показателям. Группа 2 была представлена исключительно лицами мужского пола, что согласуется с результатами исследований, показавших более высокую распространенность эрозивного эзофагита у мужчин всех возрастных групп [7–9]. Возрастно-половой состав и антропометрическая характеристика исследуемых групп представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Table 1. Characteristics of the study groups

| Показатель Parameter | Группа 1, $n = 37$ Group 1, $n = 37$ | Группа 2, $n = 11$ Group 2, $n = 11$ | Группа 3, $n = 18$ Group 3, $n = 18$ | p |
|--|---|---|---|------|
| Возраст, лет Age, years | 48,0 (40,0; 54,0) | 48,5 (40,0; 56,0) | 46,5 (42,0; 54,0) | 0,93 |
| Пол, муж. (%) Gender, men (%) | 26 (70,3 %) | 11 (100 %) | 9 (50 %) | 0,03 |
| ИМТ, кг/м ² BMI, kg/m ² | 28,7 (25,6; 31,7) | 28,2 (24,5; 30,9) | 26,8 (22,3; 31,6) | 0,72 |

Таблица 2. Экспрессия MTNR1B в исследуемых группах (Me [25 %; 75 %])

Table 2. MTNR1B expression in the study groups (Me [25 %; 75 %])

| Показатель Parameter | Группа 1, $n = 37$ Group 1, $n = 37$ | Группа 2, $n = 11$ Group 2, $n = 11$ | Группа 3, $n = 18$ Group 3, $n = 18$ | p |
|--|---|---|---|-------|
| Экспрессия MTNR1B MTNR1B expression | 0,436 (0,123; 0,668) | 0,127 (0,059; 0,156) | 0,437 (0,202; 0,692) | 0,016 |

При ИГХ исследовании биоптатов СОП мы обнаружили, что положительная реакция с антителами к MTNR1B определялась во всех изученных образцах (100 % случаев): и у пациентов группы сравнения, и в группах пациентов с ЭРБ. Не выявлено связи интенсивности экспрессии MTNR1B с полом ($p = 0,7$), возрастом ($p = 0,36$) и ИМТ ($p = 0,068$) пациентов.

Анализ интенсивности экспрессии рецепторов мелатонина выявил достоверные отличия в исследуемых группах ($H = 8,23$; $p = 0,016$). При проведении апостериорных сравнений в группе ЭРБ по отношению к группе сравнения отмечались более низкие значения экспрессии MTNR1B ($p = 0,033$). При сравнении экспрессии MTNR1B в группах с ЭРБ и НЭРБ также наблюдались более низкие значения экспрессии у пациентов с ЭРБ ($p = 0,017$). В группе НЭРБ по отношению к группе сравнения значимых различий экспрессии MTNR1B не выявлено ($p > 0,05$). Данные экспрессии MTNR1B в исследуемых группах представлены в таблице 2.

Полученные данные демонстрируют достоверное снижение интенсивности экспрессии рецепторов мелатонина в СОП у пациентов с ЭРБ (рис. 1).

Очень низкая экспрессия MTNR1B чаще всего отмечалась в группе пациентов с ЭРБ (72,7 %; 95 % ДИ: 42,9–90,8 %), реже – в группе сравнения (15,8 %; 95 % ДИ: 5,0–40,1 %) и группе с НЭРБ (18,9 %; 95 % ДИ: 9,2–34,5 %). Группа пациентов с ЭРБ характеризовалась достоверно большей частотой случаев очень низкого уровня экспрессии MTNR1B по отношению к группе сравнения ($p = 0,0041$) и группе с НЭРБ ($p = 0,0017$). Распределение пациентов исследуемых групп по уровню экспрессии MTNR1B представлено в таблице 3.

На рисунке 2 представлены микрофотографии фрагментов СОП пациентов с НЭРБ, ЭРБ и группы сравнения.

Корреляционный анализ выявил наличие отрицательной статистически достоверной связи между тяжестью эндоскопических изменений СОП и интенсивностью экспрессии MTNR1B: $r = -0,40$; $p = 0,0015$ (рис. 3).

Анализ результатов ИФА выявил статистически значимые различия уровня 6-COMT в суточной моче, в дневной ее порции и индекса ночь/день у пациентов исследуемых групп (табл. 4).

Парные сравнения групп позволили установить достоверные различия уровня 6-COMT в суточной моче между группами 1 и 2 ($p = 0,0042$), 2 и 3 ($p = 0,043$). Также выявлены достоверные различия уровня 6-COMT в дневной порции мочи между группами 1 и 2 ($p = 0,0024$). В группе 1 в сравнении с группой 2 и группой 3 отмечается значимое

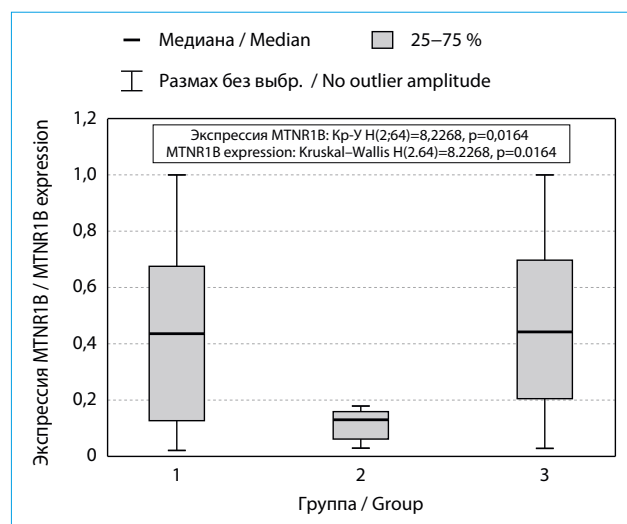


Рис. 1. Интенсивность экспрессии рецепторов MTNR1B в исследуемых группах

Fig. 1. The expression intensity of MTNR1B receptors in the studied groups

Таблица 3. Распределение пациентов исследуемых групп по уровню экспрессии MTNR1B (n/%)
Table 3. The distribution of patients in the studied groups according to the level of MTNR1B expression (n/%)

| Уровень экспрессии MTNR1B MTNR1B expression level | Группа 1, n = 37 Group 1, n = 37 | Группа 2, n = 11 Group 2, n = 11 | Группа 3, n = 18 Group 3, n = 18 | p |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Очень низкий Very low | 7/18,9 | 8/72,7 | 3/15,8 | $p_{1-3} = 0,58$ $p_{1-2} = 0,0017$ $p_{2-3} = 0,0041$ |
| Низкий Low | 10/27,0 | 2/18,2 | 5/26,3 | $p_{1-3} = 0,60$ $p_{1-2} = 0,44$ $p_{2-3} = 0,45$ |
| Умеренный Medium | 8/21,6 | 1/9,1 | 5/26,3 | $p_{1-3} = 0,43$ $p_{1-2} = 0,33$ $p_{2-3} = 0,24$ |
| Высокий High | 3/8,1 | 0 | 4/21,1 | $p_{1-3} = 0,15$ $p_{1-2} = 0,45$ $p_{2-3} = 0,13$ |
| Очень высокий Very high | 9/24,3 | 0 | 1/5,3 | $p_{1-3} = 0,09$ $p_{1-2} = 0,074$ $p_{2-3} = 0,62$ |

Таблица 4. Показатели уровня 6-COMT в исследуемых группах
Table 4. 6-SOMT values in the studied groups

| Показатель Parameter | Группа 1 Group 1 | Группа 2 Group 2 | Группа 3 Group 3 | p |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 6-COMT в суточной моче, нг/мл | 83,18# (48,99; 127,34) | 47,16* (30,53; 72,12) | 80,0 (33,42; 113,86) | $H = 10,62$; $p = 0,0049$ |
| 6-COMT в дневной порции мочи, нг/мл | 88,31# (69,31; 132,72) | 61,12 (5,62; 74,16) | 64,95 (16,67; 152,36) | $H = 11,48$; $p = 0,0032$ |
| 6-COMT в ночной порции мочи, нг/мл | 48,55 (13,17; 94,77) | 44,10 (21,02; 80,68) | 85,71 (60,20; 151,0) | $H = 5,55$; $p = 0,062$ |
| Индекс ночь/день, % | 33,7 ± 19,6*., # | 54,0 ± 13,1 | 59,6 ± 17,9 | $H = 20,31$; $p = 0,0000$ |

Примечание: статистически значимые различия ($p < 0,05$): * — по отношению к группе сравнения; # — между группами 1 и 2.
 Notes: statistically significant differences ($p < 0,05$): * — in relation to the comparison group; # — group 1 vs group 2.

смещение пика синтеза мелатонина на дневные часы, что выражается в статистически значимом снижении индекса ночь/день ($p = 0,003$ и $0,00018$ соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о значимом снижении суточного уровня 6-COMT при ЭРБ. Группа пациентов с НЭРБ характеризовалась более высокими значениями 6-COMT в дневные часы со смещением пика синтеза мелатонина на дневное время. Полученные результаты свидетельствуют о защитном действии мелатонина от повреждающего действия рефлюктата. При этом увеличение именно дневной продукции этого гормона сопряжено с меньшим повреждением СОП [10].

Исходя из этого, с целью изучения связи между уровнем мелатонина и степенью экспрессии MTNR1B был проведен корреляционный анализ. Выявлена статистически значимая связь уровня 6-COMT в моче с экспрессией MTNR1B в СОП (табл. 5).

Обсуждение

В 2009 г. была опубликована альтернативная концепция патогенеза РЭ, согласно которой РЭ начинается как цитокин-опосредованное повреждение. Авторы этой концепции на животной модели показали, что при ГЭРБ воспаление не начиналось в слизистой оболочке. Под действием рефлюктата наблюдалась глубокая базальноклеточная и папиллярная гиперплазия, но поверхностные клетки оставались интактными [11]. В сопутствующих экспериментах *in vitro* было обнаружено, что под воздействием компонентов желчи культуры эпителия пищевода продуцируют интерлейкин-8, который является мощным провоспалительным цитокином. На основании этого был сделан вывод о том, что РЭ развивается как цитокин-опосредованное воспалительное повреждение, при котором соляная кислота и компоненты желчи не повреждают эпителий напрямую, а побуждают их продуцировать

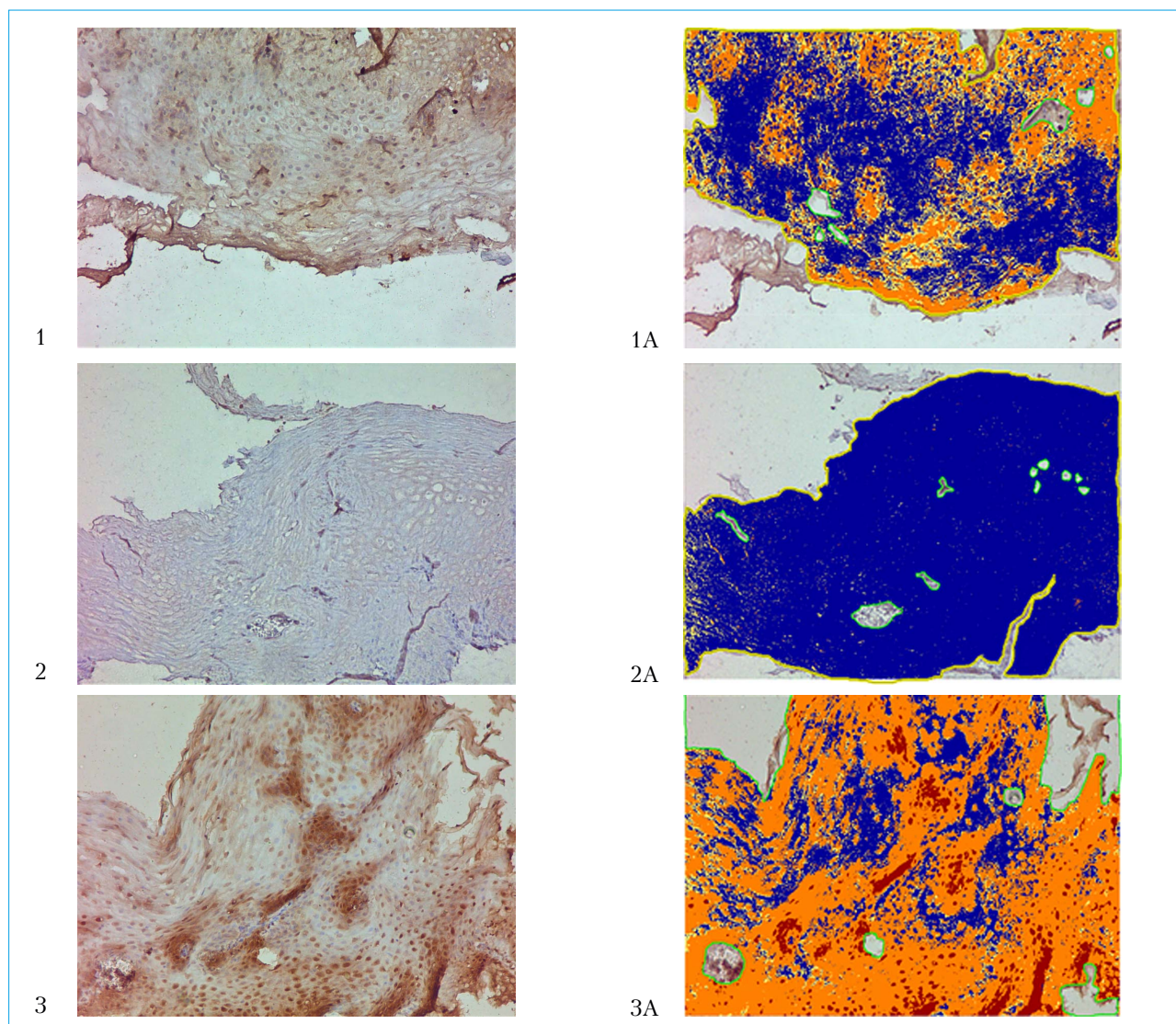


Рис. 2. Многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациентов исследуемых групп

1 — многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациента с НЭРБ. Окраска с использованием антител к MTNR_{1B} в разведении 1:100, ув. $\times 20$; 1A — многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациента с НЭРБ. Результат работы алгоритма “positive pixel count” программы Aperio Image Scope (красные поля — выраженная экспрессия, оранжевые — умеренно выраженная, желтые — слабовыраженная, синяя окраска — отсутствие экспрессии); 2 — многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациента с ЭРБ. Клетки подвержены гидропической дистрофии. Окраска с использованием антител к MTNR_{1B} в разведении 1:100, ув. $\times 20$; 2A — многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациента с ЭРБ. Выраженное угнетение экспрессии рецепторов MTNR_{1B}. Результат работы алгоритма “positive pixel count” программы Aperio Image Scope (красные поля — выраженная экспрессия, оранжевые — умеренно выраженная, желтые — слабовыраженная, синяя окраска — отсутствие экспрессии); 3 — многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациента из группы сравнения. Окраска с использованием антител к MTNR_{1B} в разведении 1:100, ув. $\times 20$; 3A — многослойный плоский неороговевающий эпителий дистального отдела пищевода пациента из группы сравнения. Результат работы алгоритма “positive pixel count” программы Aperio Image Scope (красные поля — выраженная экспрессия, оранжевые — умеренно выраженная, желтые — слабовыраженная, синяя окраска — отсутствие экспрессии).

Fig. 2. Non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus in patients of the studied groups
1 — non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus in a NERD patient. MTNR_{1B} antibodies staining, 1:100 dilution, magn. $\times 20$; 1A — non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus in a NERD patient. The positive pixel count data of the Aperio Image Scope software (red fields denote pronounced expression, orange — moderately expressed, yellow — weakly expressed, blue — lack of expression); 2 — non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus of a ERD patient. Cells are susceptible to hydropic dystrophy. MTNR_{1B} antibodies staining, 1:100 dilution, magn. $\times 20$; 2A — non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus of a ERD patient. Severe inhibition of MTNR_{1B} receptor expression. The positive pixel count data of the Aperio Image Scope software (red fields denote pronounced expression, orange — moderately expressed, yellow — weakly expressed, blue — lack of expression); 3 — non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus of a control group patient. MTNR_{1B} antibodies staining, 1:100 dilution, magn. $\times 20$; 3A — non-keratinised stratified squamous epithelium of the distal esophagus of a control group patient. The positive pixel count data of the Aperio Image Scope software (red fields denote pronounced expression, orange — moderately expressed, yellow — weakly expressed, blue — lack of expression)

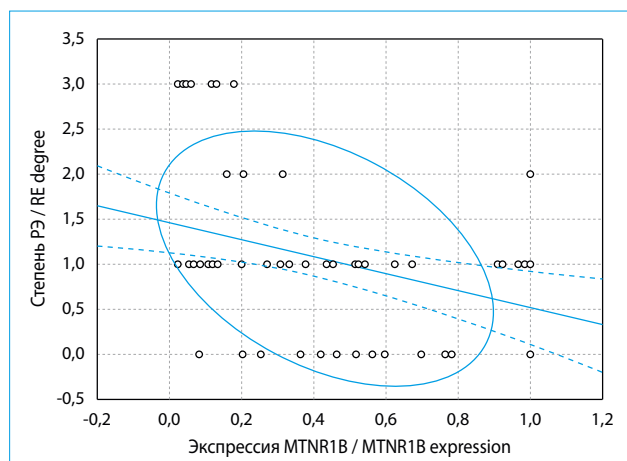


Рис. 3. Связь тяжести эндоскопических изменений СОП и интенсивности экспрессии MTNR1B

Fig. 3. Relationship between the severity of endoscopic changes in esophageal mucosa and the MTNR1B expression intensity

цитокины, которые и вызывают гибель клеток. Также имеются сведения о том, что данная концепция применима и к модели патогенеза РЭ у людей. Так, Т. Kondo et al. [12] показали, что воздействие соляной кислоты на слизистую оболочку (СО) дистального отдела пищевода здоровых добровольцев вызывает изменение уровня провоспалительных цитокинов и простагландина E2.

Являясь мощным антиоксидантом, мелатонин играет важную роль в защите СО ЖКТ от повреждающего действия агрессивных экзо- и эндогенных факторов. Исследования показывают, что мелатонин предотвращает образование язв и увеличивает скорость их заживления благодаря связыванию активных форм кислорода, ингибированию образования металлопротеиназ-3 и -9, повышению в СО концентрации простагландина E2 и усилению кровотока [6].

G. Klupińska et al. показали снижение уровня мелатонина у пациентов с функциональной изжогой и НЭРБ [13]. Опубликованный ранее фрагмент нашего исследования выявил различия в концентрации 6-COMT в моче пациентов с ГЭРБ в сравнении с пациентами без ГЭРБ. У пациентов с ГЭРБ отмечалось достоверное снижение уровня 6-COMT в суточной моче и ночной ее порции. Тяжелая (эрозивная) форма ГЭРБ сочеталась с более

низкими показателями 6-COMT, а именно в суточной моче и дневной ее порции. При этом снижение уровня 6-COMT было сопряжено с большей степенью повреждения СО дистального отдела пищевода. Кроме того, у пациентов с ЭРБ сохранялась относительно правильная ритмика синтеза мелатонина, в то время как у пациентов с НЭРБ отмечалось достоверно значимое смещение синтеза мелатонина на дневные часы. Также было показано, что эзофагопротективное действие мелатонина обусловлено повышением именно дневной его продукции, что подтверждается наличием корреляционной связи между величиной индекса ночь/день, характеризующего суточную ритмику синтеза мелатонина, и степенью повреждения СОП у пациентов с ГЭРБ. Учитывая, что в дневное время продукция мелатонина эпифизом очень низкая, т.к. синтез эпифизарного мелатонина блокируется светом, можно предположить, что высокий уровень дневного мелатонина при РЭ обеспечивается именно энтеральным его синтезом, который стимулируется повышением потребности в этом гормоне на фоне повреждения СОП [8].

В исследованиях на животных показали, что блокада MTNR1B с помощью лизиндола значительно ослабляет защиту СО, вызванную мелатонином, и замедляет скорость заживления язв, что свидетельствует о том, что мелатонин проявляет гастропротекцию через активацию MTNR1B [6]. Результаты нашего исследования указывают на связь снижения интенсивности экспрессии MTNR1B эпителиоцитами СОП с уменьшением дневного уровня мелатонина у пациентов с ГЭРБ ($r = 0,42$; $p = 0,018$).

Таким образом, полученные нами данные показали, что у пациентов с ЭРБ отмечается достоверное снижение интенсивности экспрессии MTNR1B в СОП в сравнении с пациентами без ГЭРБ, а также с пациентами с НЭРБ. При этом снижение экспрессии MTNR1B коррелирует со степенью тяжести эндоскопических изменений СОП, что подтверждается обнаруженной обратной взаимосвязью умеренной силы между интенсивностью экспрессии MTNR1B и степенью РЭ ($r = -0,40$; $p = 0,0015$).

В настоящее время основным принципом лечения ГЭРБ является обязательное длительное назначение ингибиторов протонной помпы: основной курс

Таблица 5. Связь уровня мелатонина с интенсивностью экспрессии рецепторов MTNR1B эпителиоцитами пищевода

Table 5. Relationship between the melatonin level and the intensity of MTNR1B receptor expression by esophageal epithelial cells

| Пары коррелируемых показателей Pairs of correlated indicators | r | p |
|--|-------|-------|
| 6-COMT в дневной моче & экспрессия MTNR1B 6-SOMT in daytime urine & MTNR1B expression | 0,42 | 0,018 |
| Индекс ночь/день & экспрессия MTNR1B Night / day index & MTNR1B expression | -0,43 | 0,016 |

сроком не менее 4–8 недель и поддерживающий курс 6–12 месяцев. При несоблюдении описанных сроков лечения вероятность рецидива РЭ в течение года составляет 90–98 % [14]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что низкая интенсивность экспрессии MTNR1B ассоциирована с выраженностью эндоскопических изменений СОП при ГЭРБ. Можно предположить, что модуляция экспрессии указанных рецепторов может служить мишенью при лечении пациентов с ГЭРБ. Таким образом, дальнейшее изучение особенностей синтеза мелатонина, экспрессии и строения его рецепторов с СОП является перспективным направлением и требует дальнейшего исследования.

Таким образом, исследование роли мелатонина в патофизиологии верхнего отдела ЖКТ позволит использовать этот индол в качестве терапевтического средства для уменьшения степени повреждения СО ЖКТ, что может способствовать улучшению качества оказания медицинской помощи пациентам с ГЭРБ и профилактике ее осложнений.

Выводы

Полученные нами данные позволяют сделать следующие выводы.

Литература / References

1. Orlando R.C. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42:584–88.
2. Евсютина Ю.В. Алгоритм ведения пациентов с рефрактерной формой ГЭРБ. *РМЖ.* 2015;28:1682–3. [Evsytina Yu.V. Treatment algorithm for patients with refractory form of GERD. *Rus. Med. J.* 2015;28:1682–3 (In Russ.)].
3. Vakil N., van Zanten S.V., Kahrilas P., Dent J., Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(8):1900–20. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00630.x
4. Katz P.O., Gerson L.B., Vela M.F. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(3):308–28. DOI: 10.1038/ajg.2012.444
5. Brzozowska I., Ptak-Belowska A., Pawlik M., et al. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin in the mechanism of gastric defense. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(7):47–56.
6. Brzozowska I., Strzalka M., Drozdowicz D., et al. Mechanisms of esophageal protection, gastroprotection and ulcer healing by melatonin. implications for the therapeutic use of melatonin in gastroesophageal reflux disease (GERD) and peptic ulcer disease. *Curr Pharm Des.* 2014;20(30):4807–15.
7. Спасова Т.Е., Григорьева Е.В. Гендерные особенности гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.* 2015;2(102):38–41. [Spasova T.E., Grigoryeva E.V. Gender characteristics of gastroesophageal reflux disease. *Bulletin of the VSNS SB RAMS.* 2015;2(102):38–41 (In Russ.)].
8. Гайзер Л.К. Клиническая характеристика гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у пожилых. *Вестник НАО КазНМУ.* 2013;4(1):60–2. [Gaizer L.K. Clinical characteristics of gastroesophageal reflux disease in the elderly. *Vestnik KazNMU.* 2013;4(1):60–2 (In Russ.)].
9. Mochizuki N., Fujita T., Kobayashi M., Yamazaki Y., Terao S., et al. Factors associated with the presentation of erosive esophagitis symptoms in health checkup subjects: A prospective, multicenter cohort study. *Plos One.* 2018;13(5):e0196848.
10. Карпович О.А., Шишко В.И. Протективная роль мелатонина при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Гепатология и гастроэнтерология.* 2019;3(1):61–5. [Karpovich O.A., Shishko V.I. The protective role of melatonin in gastroesophageal reflux disease. *Hepatology and Gastroenterology.* 2019;3(1):61–5 (In Russ.)].
11. Souza R.F., Huo X., Mittal V., Schuler C.M., Carmack S.W., Zhang H.Y., et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology.* 2009;137:1776–84.
12. Kondo T., Oshima T., Tomita T., Fukui H., Watari J., et al. Prostaglandin E2 mediates acid-induced heartburn in healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;304:568–73.
13. Klupińska G., Wiśniewska-Jarosińska M., Harasiuk A., Chojnacki C., Stec-Michalska K., et al. Nocturnal secretion of melatonin in patients with upper digestive tract disorders. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(5):41–50.
14. Modlin I.M., Hunt R.H., Malfertheiner P., Moayyedi P., et al. Nonerosive reflux disease — denning the entity and delineating the management. *Digestion.* 2008;78(1):1–5.

Сведения об авторах

Карпович Олеся Анатольевна* — ассистент 2-й кафедры внутренних болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет».
Контактная информация: olesjakarpovich@rambler.ru;
230009, Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3801-2336>

Штабинская Татьяна Тадеушевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии УО «Гродненский государственный медицинский университет».
Контактная информация: shtabik@list.ru;
230009, Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80.

Шिशко Виталий Иосифович — кандидат медицинских наук, доцент 2-й кафедры внутренних болезней, проректор по лечебной работе УО «Гродненский государственный медицинский университет».
Контактная информация: vshyshko@mail.ru;
230009, Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8244-2747>

Колодзейский Ярослав Александрович — врач-эндоскопист (заведующий эндоскопическим отделением) УЗ «Городская клиническая больница № 2 г. Гродно».
Контактная информация: mashrooms09@mail.ru;
230011, Республика Беларусь, г. Гродно, ул. Горького, 80.

Information about the authors

Olesya A. Karpovich* — Research Assistant, Second Department of Internal Diseases, Grodno State Medical University.
Contact information: olesjakarpovich@rambler.ru;
230009, Republic of Belarus, Grodno, Gorkogo str., 80.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3801-2336>

Tatyana T. Shtabinskaya — Cand. Sci. (Med.), Ass. Prof., Department of Pathological Anatomy, Grodno State Medical University.
Contact information: shtabik@list.ru;
230009, Republic of Belarus, Grodno, Gorkogo str., 80.

Vitaliy I. Shishko — Cand. Sci. (Med.), Ass. Prof., Second Department of Internal Diseases, Vice-Rector for Medical Work, Grodno State Medical University.
Contact information: vshyshko@mail.ru;
230009, Republic of Belarus, Grodno, Gorkogo str., 80.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8244-2747>

Yaroslav A. Kolodzeisky — Endoscopist, Departmental Head, Department of Endoscopy, Grodno City Clinical Hospital No. 2.
Contact information: mashrooms09@mail.ru;
230011, Republic of Belarus, Grodno, Gorkogo str., 80.

Поступила: 27.01.2020 Принята: 25.03.2020 Опубликовано: 30.04.2020
Submitted: 27.01.2020 Accepted: 25.03.2020 Published: 30.04.2020

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author