



Ю.М. Степанов, Ю.С. Бреславець
Дніпропетровська державна медична академія

Оцінка вмісту циклооксигенази 2-го типу в слизовій оболонці гастродуоденальної зони у хворих на НПЗП-гастропатії

Ключові слова

НПЗП-гастропатія, циклооксигеназа 2-го типу, імунореактивні реакції, кислотопродукуюча функція шлунка, культура *Helicobacter pylori*.

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) є однією з найпоширеніших груп лікарських засобів у світі, що зумовлено унікальним поєднанням аналгетичної, протизапальної, дезагрегатної та антипіретичної властивостей. Щодня понад 30 млн людей приймають НПЗП. Частка цих препаратів серед усіх вживаних населенням світу медикаментів становить близько 20 % [3, 5, 12, 13]

Більша частина хворих приймають НПЗП з метою знеболювання. Важливість та необхідність застосування НПЗП у хворих саме з вираженим больовим синдромом, зокрема при патології опорно-рухового апарату, продемонстровано у серії досліджень тривалістю від 6 до 18 міс (VIGOR, CLASS, TARGET та MEDAL) [6, 11].

Ефективність НПЗП є беззаперечною, однак їх застосування спричиняє виникнення побічних ефектів у різних системах організму людини, зокрема ускладнення з боку травного каналу (ТК). Найчастіше патологічні зміни спостерігаються в антральному відділі шлунка, рідше — у цибулині дванадцятипалої кишки (ДПК). НПЗП зумовлюють 20 % усіх побічних ефектів фармакотерапії в Англії, 25 % — у США і понад 40 % — в Україні; при цьому 90 % становлять гастродуоденальні ускладнення [1, 10].

Механізми ураження слизової оболонки гастродуоденальної зони на тлі прийому НПЗП остаточно не вивчені, однак, на думку більшості науковців, провідну роль у патологічному процесі відіграє фермент циклооксигеназа (ЦОГ). Взаємодіючи практично з усіма мітохондріальними

ферментами, НПЗП найбільш впливають на ЦОГ, різко пригнічуючи її активність [2, 9]. Є дві ізоформи циклооксигенази: ЦОГ-1 та ЦОГ-2. Як відомо, ЦОГ-2 індукується в осередку запалення та стимулює продукцію прозапальних простагландинів. Саме тому препаратом вибору вважають селективні інгібітори ЦОГ-2. За даними різних авторів, ризик ускладнень з боку ТК при застосуванні неселективних та селективних інгібіторів ЦОГ-2 становить відповідно 14,5 та 9,4 %, пептичної виразки — 6,28 та 1,74 % [2, 4, 7, 8].

Незважаючи на велику кількість наукових робіт, присвячених цій проблемі, залишається багато невирішених питань щодо ролі ЦОГ у патологічному процесі при НПЗП-гастропатіях, зокрема залежно від селективності препарату.

Мета дослідження — вивчити вміст ЦОГ-2 у слизовій оболонці гастродуоденальної зони при НПЗП-гастропатіях імуногістохімічним методом порівняно з аналогічним показником осіб без морфологічно верифікованої патології ТК; оцінити взаємозв'язок між вмістом ЦОГ-2, селективністю НПЗП, наявністю *H. pylori* та рівнем кислотопродукуючої функції шлунка.

Матеріали та методи

Під наглядом перебували 64 пацієнти, з них 44 із запальними та ерозивними ураженнями гастродуоденальної зони (20 жінок та 24 чоловіки віком від 18 до 67 років), які склали основну групу, та 20 без морфологічно верифікованої патології ТК (7 жінок та 13 чоловіків віком від 18 до 67 років), які склали контрольну групу. Для участі у

дослідженні відбирали хворих, які амбулаторно або стаціонарно лікувалися стосовно основного захворювання та приймали з терапевтичною метою НПЗП тривалий час (від 1 міс до 3 років). У 31 пацієнта основної групи діагностовано остеоартроз з вираженим больовим синдромом, зокрема деформуючий з ПФС 2–3 ст., у 1 — хворобу Бехтерева, у 4 — ревматоїдний артрит та у 7 — постінфарктний кардіосклероз.

30 пацієнтів (68 %) мали скарги з боку ТК, їм було проведено ФГДС у плановому порядку. Інші хворі, не мали скарг на момент огляду, але зазначали періодичні скарги в анамнезі, які пов'язували з початком прийому НПЗП. Цим пацієнтам ФГДС було проведено, враховуючи основний діагноз, наявність скарг в анамнезі та тривалість прийому НПЗП. Залежно від селективності НПЗП усіх пацієнтів було розподілено на дві групи: хворі I групи (28 пацієнтів) приймали неселективні НПЗП («Аспірин», диклофенак), пацієнти II (16 осіб) — селективні інгібітори ЦОГ-2 (німесулід, «Моваліс»). Обидві основні та контрольна групи були порівнянними за співвідношенням статей ($p > 0,40$) та віком ($p > 0,30$).

Стан слизової оболонки оцінювали за біопсійним матеріалом. Ендоскопічне дослідження проводили за допомогою фіброгастроскопа Pentax-FG-29; рН-метрію — за методом Чернобрового. Для проведення морфологічного дослідження біопсійний матеріал хворих, який отримували під час ФГДС, фіксували в 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну протягом 10–12 год для збереження цілісності клітин і тканин. Потім матеріал заливали у парафін. Парафінові тонкошарові зрізи товщиною 3–5 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином за стандартною методикою та піддавали мікроскопічному дослідженню. Для отримання зрізів використовували мікротом зі станцією прийому зрізів (Microm HM-340). Світлову мікроскопію проводили за допомогою світлового мікроскопа Leica DMLS з використанням об'єктивів $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$. У подальшому визначення вмісту ЦОГ-2 проводили імуногістохімічним методом за 4-бальною шкалою відповідно до рекомендацій Lazaraki G. і співавт. (2008). Тонкошарові парафінові зрізи інкубували з первинними антитілами у вологих камерах за температури 23–25 °С протягом 30 хв. Як первинні антитіла використовували спектр антитіл, який включав маркери ЦОГ-2 (клон SP21, LabVision, США). Для кожного маркера виконували контрольні дослідження з метою виключення хибнопозитивних або хибнонегативних результатів. Вторинні антитіла, специфічно тропні до первинних, наносили на зрізи та інкубували у

вологих камерах протягом 30 хв з промиванням у ТРИС-буферному розчині між етапами протягом 10 хв. Імуногістохімічні дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління UltraVision LP (LabVision, США). Ідентифікацію реакції проводили при нанесенні хромогену діамінамінобензидину (DAB) під контролем мікроскопа протягом від 20 с до 3 хв, з виявом у вигляді темно-коричневого забарвлення цитоплазми клітин. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1–3 хв. При проведенні імуногістохімічних досліджень для перевірки якості та специфічності реакцій завжди використовували контрольні зрізи з тканинами, в яких даний маркер виявляється в усіх випадках та значною мірою. Крім того, як внутрішній контроль оцінювали реакції з незмінним інтактним епітелієм. Кількісні та якісні показники вмісту маркерів вивчали як мінімум у 8–10 випадково обраних полях зору мікроскопа при $\times 400$ та $\times 1000$.

Оцінку вмісту кожного імуногістохімічного маркера проводили індивідуально. Так, імунореактивність ЦОГ-2 оцінювали за сукупним показником інтенсивності забарвлення і площі позитивних міток відповідно до рекомендацій (Mgena і співавт., 2005). Інтенсивність визначали за такими градаціями: 0 — негативна реакція, 1 — слабе дифузне забарвлення, 2 — помірне гранулярне забарвлення, 3 — інтенсивне гранулярне, а площу — за відсотком забарвлених клітин від усієї площі тканини (до 10 %, 10–89 %, понад 90 %). Отримували сукупний показник: 1 (+) (інтенсивність 1, площа 10–100 % забарвлених клітин або інтенсивність 2–3, площа до 10 % забарвлених клітин), 2 (++) (у діапазоні інтенсивності 2, понад 10 % забарвлених клітин, до інтенсивності 3, з менше ніж 90 % забарвлених клітин) і 3 (+++) (інтенсивність 3, понад 90 % забарвлених клітин).

Статистичну обробку матеріалів досліджень проводили з використанням пакета програм Statistica. Для оцінки достовірності різниці середніх величин застосовували критерії Стюдента і Манна–Уїтні, відносних величин — критерій відповідності Хі-квадрат (χ^2), в тому числі з поправкою Йейтса; для оцінки взаємозв'язку між окремими ознаками — коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Морфологічна картина в основних групах хворих суттєво не відрізнялася. За результатами ФГДС пептичну виразку шлунка виявлено у 5 (18 %) хворих I групи і 3 (19 %) — II ($p > 0,90$);

Таблиця. Інтенсивність ЦОГ-2 залежно від наявності запальних та ерозивних уражень гастродуоденальної зони та селективності НПЗП

Інтенсивність	I група	II група	p між I і II групами	Контрольна група
0	0***	0**	> 0,99	10 (50 %)
1 (+)	5 (18 %)*	3 (19 %)	> 0,90	9 (45 %)
2 (++)	11 (39 %)*	9 (56 %)**	> 0,20	1 (5 %)
3 (+++)	12 (43 %)**	4 (25 %)	> 0,20	0

Примітка. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,002$; *** — $p < 0,001$ порівняно з контрольною групою.

пептичну виразку ДПК — у 3 (11 %) хворих I групи ($p > 0,40$). Гіперпластичний гастрит з активністю від (+) до (+++) виявлено відповідно у 14 (50 %) і 6 (37 %) хворих ($p > 0,40$), активний гастрит без гіперплазії — у 8 (28 %) і 7 (44 %) ($p > 0,30$). У 2 пацієнтів I групи ерозивний гастрит поєднувався з виразкою ДПК.

Враховуючи важливу роль *H. pylori* у процесах ультрогенезу при проведенні швидкого уреазного тесту виявлено ступінь гелікобактеріозу. Інфікованість *H. pylori* становила у I групі 68 % ($n = 19$), у II — 50 % ($n = 8$), у контрольній — 50 % ($n = 10$). Незважаючи на відсутність морфологічно верифікованої патології ТК у пацієнтів контрольної групи, за частотою обсіменіння *H. pylori* ця група вірогідно не відрізнялася від груп дослідження ($p > 0,20$).

НПЗП-гастропатії належать до кислото залежних захворювань. Тому важливим є вивчення кислотопродукуючої функції шлунка у цих хворих залежно від селективності препарату.

За результатами рН-метрії підвищений рівень рН+ мали 11 (39 %) хворих I групи і 12 (75 %) — II ($p < 0,05$), рН- — 17 (61 %) і 4 (25 %) хворих відповідно ($p < 0,05$). У 12 (60 %) осіб контрольної групи рівень рН відповідав нормі ($p < 0,001$

порівняно з I і II групами), в 4 (20 %) випадках зареєстровано рН+, в 4 (20 %) — рН-. За частотою виявлення підвищеного рівня рН пацієнти контрольної групи наближалися до хворих I групи ($p > 0,10$). У жодного хворого дослідних груп не зафіксовано рН — N, тоді як у 60 % випадків у контрольній групі виявлено нормоцидний стан кислотопродукуючої функції шлунка, тобто достовірних даних щодо впливу НПЗП залежно від їх селективності на кислотопродукуючу функцію шлунка не виявлено (рис. 1).

При імуногістохімічному дослідженні виявлено, що імунореактивність ЦОГ-2 суттєво вища ($p < 0,001$) у пацієнтів дослідних груп (таблиця, рис. 2), що свідчить про збільшення вмісту ЦОГ внаслідок патологічних реакцій у слизовій оболонці гастродуоденальної зони, зумовлених прийомом НПЗП. Середній рівень ЦОГ-2 у хворих I і II груп дорівнював ($2,3 \pm 0,1$) і ($2,1 \pm 0,2$) ум. од. відповідно, що більше ніж в 3 рази перевищувало аналогічний показник пацієнтів контрольної групи ($0,6 \pm 0,1$ ум. од.) ($p < 0,001$) (див. таблицю, рис. 2).

Достовірної різниці у вмісті ЦОГ-2 залежно від селективності НПЗП не виявлено. Однак цей фермент діяв безпосередньо у клітинах, ура-

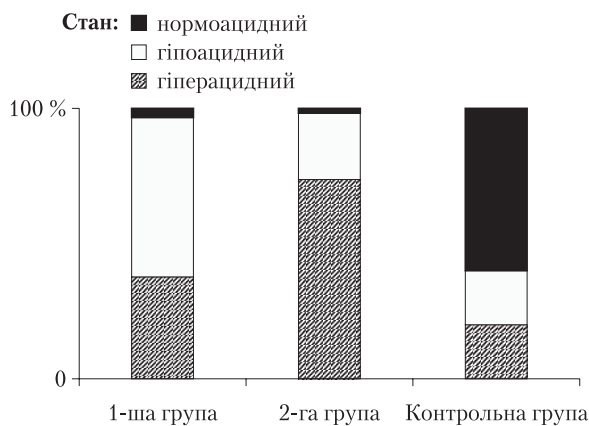


Рис. 1. Стан кислотопродукуючої функції шлунка залежно від селективності НПЗП

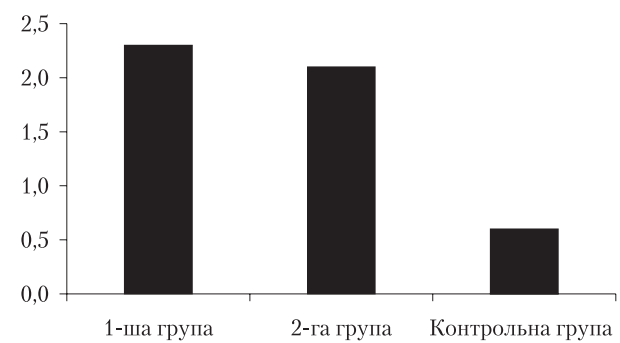


Рис. 2. Середні рівні інтенсивності ЦОГ-2 у хворих із запальними та ерозивними ураженнями гастродуоденальної зони

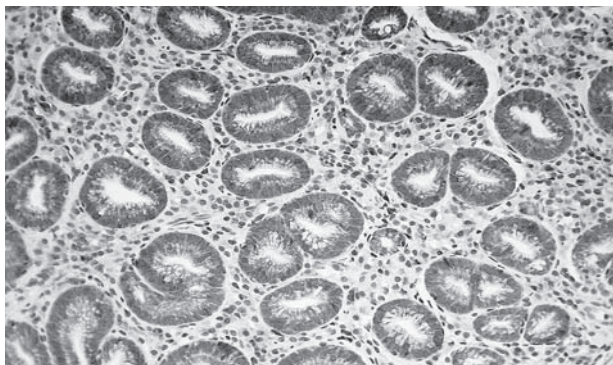


Рис. 3. Біоптат антрального відділу шлунка хворого П., 24 роки, НПЗП-гастропатія Імуногістохімічний метод з антитілами ЦОГ-2 (клон SP21, LabVision, США)

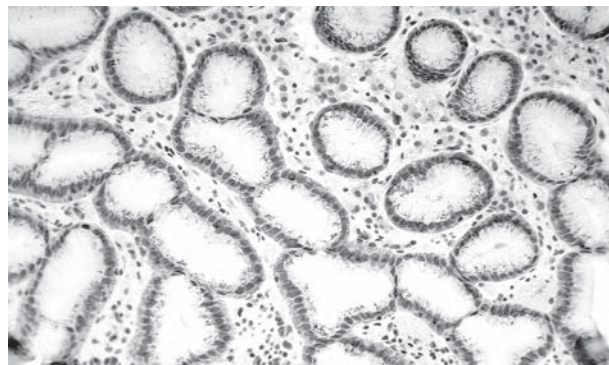


Рис. 4. Біоптат антрального відділу шлунка хворого Ш., 20 років (контрольна група) Імуногістохімічний метод з антитілами ЦОГ-2 (клон SP21, LabVision, США)

жених патологічним процесом, що свідчить про специфічність реакції (рис. 3, 4).

Таким чином, застосування НПЗП протягом тривалого часу впливає на зниження захисних властивостей слизової оболонки гастродуоденальної зони, насамперед на рівень простагландинів унаслідок активації прозапальних чинників, спричинених дією ЦОГ.

Висновки

Значно підвищений рівень вмісту ЦОГ-2 у хворих на НПЗП-гастропатії порівняно з таким у осіб, які не мали ендоскопічно верифікованої патології ТК ($p < 0,001$), свідчить про безпосередній вплив НПЗП на розвиток патологічного процесу у слизовій оболонці гастродуоденальної зони при НПЗП-гастропатіях.

Ураховуючи тенденцію до збільшення вмісту ЦОГ-2 у хворих, які приймали неселективні

НПЗП, можна стверджувати про наявність прямого взаємозв'язку між ступенем ураження слизової оболонки гастродуоденальної зони та селективністю НПЗП.

Підвищення імунореактивності ферменту ЦОГ-2 безпосередньо у клітинах, уражених патологічним процесом, свідчить про специфічність цієї реакції при запальних та деструктивних ураженнях гастродуоденальної зони, зокрема асоційованих з тривалим прийомом НПЗП.

Тенденція до підвищення кислотності шлунка у хворих, які приймали неселективні НПЗП, свідчить про наявність взаємозв'язку між станом кислотопродукуючої функції шлунка та селективністю НПЗП.

Згідно з отриманими результатами суттєвої різниці у впливі НПЗП на кислотопродукуючу функцію шлунка залежно від їх селективності не встановлено.

Список літератури

- Ишанкулова Д.М., Холова З.У. Н. рулоги и НПВП-индуцированные гастро- и дуоденопатии // 11-я Рос. гастроэнтерологич. неделя, 2005.— 25 с.
- Катеренчук І., Ткаченко Л., Ярмола Т., Стародубцев Г. Ефективність і безпечність застосування мелоксикаму у терапії хворих на остеоартроз // Ліки України.— 2005.— № 4.— С. 115—117.
- Насонов Е.Л. Специфические ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ)-2, решенные и нерешенные проблемы // Клини. фармакол. и терап.— 2000.— № 1.— С. 57—64.
- Овчинникова Л.К., Ягудина Р.И. Ненаркотические анальгетики и НПВП: необходимы, но небезобидны // Рос. аптеки.— 2007.— № 23.— С. 12—15.
- Шуба Н.М. Эффективность и безопасность НПВП в свете клинических исследований // Здоров'я України.— 2008.— № 23—24.— С. 2—4.
- Шукурова С.М., Холова З.У. НПВП-индуцированные гастро- и дуоденопатии у больных с ревматическими заболеваниями // Ревматол.— 2005.— № 3.— Тез. № 575.
- Bafal N., Noveck R., Chipman H. et al. Efficacy and safety of extended release, once daily Tramadol in chronic pain. A randomized 12 weeks clinical trial in osteoarthritis of knee // J. Pain Symptom. Manage.— 2004.— N 28 (1).— P. 59—71.
- Goldstein J.L. Videocapsule endoscopy to prospectively assess small bowel injury with celecoxib, naproxen plus omeprazole, and placebo // Clin. Gastroenterol. Hepatol.— 2005.— N 3.— P. 133—141.
- Graham D.Y., Opekun A.R., Wilingham F.F., Qureshi A.J. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID ulcers // Clin. Gastroenterol. Hepatol.— 2005.— N 3.— P. 55—59.
- Hippisley-Cox J., Coupland C., Logan R. Risk of adverse gastrointestinal outcomes in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: Population based nested case-control analysis // BMJ.— 2005.— N 331.— P. 1310—1316.
- Maiden L. et al. NSAID and bowel injury // Clin. Gastroenterol. Hepatol.— 2005.— N 3.— P. 55—59.
- Kearney P.M., Baigent C., Godwin J. et al. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Metaanalysis of randomised trials // BMJ.— 2006.— N 332.— P. 1302—1308.
- Kimura S., Tanaka M. Prevalence of Helicobacter pylori infection in hemorrhagic erosive gastroduodenitis causing upper gastrointestinal bleeding // Gut.— 2004.— N 6, suppl. 53.— P. 201.
- Maiden L. et al. Long-term effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective agents on the small bowel: a cross-sectional capsule enteroscopy study // Clin. Gastroenterol. Hepatol.— 2007.— N 5.— P. 5.

15. Schnitzer T.J., Burmester G.R., Mysler E. et al, TARGET Study Group. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial // Lancet.— 2004.— N 364.— P.665—674.
16. Tatsuguchi A., Matsui K., Shinji Y. et al. Cyclooxygenase-expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue // Hum. Pathol.— 2004.— N 35.— P.95.
17. Tatsuguchi A., Matsui K., Shinji Y. et al. Cyclooxygenase - expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue // Hum. Pathol.— 2004.— N 35.— P.95.
18. Vane J.R., Botting R.M. The future of NSAID therapy: selective COX-2 inhibitors // Clin. Practice.— 2000.— N 54.— P.7—9.
19. Wallace J.L., Devchand P.R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense // Br. J. Pharmacol.— 2005.— N 145 (3).— P.275—287.

Ю.М. Степанов, Ю.С. Бреславец

Оценка содержания циклооксигеназы 2-го типа в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны у больных с НПВП-гастропатиями

Продемонстрированы результаты иммуногистохимического исследования уровня содержания циклооксигеназы 2-го типа (ЦОГ-2) у 28 пациентов с НПВП-гастропатиями, которые принимали неселективные нестероидные противовоспалительные препараты («Аспирин», диклофенак) и 16 больных НПВП-гастропатиями, которые принимали селективные ингибиторы ЦОГ-2 (нимесулид, «Мовалис»), а также для достоверности полученных результатов — 20 человек без эндоскопически верифицированной патологии желудочно-кишечного тракта, которые составили контрольную группу. Средний уровень ЦОГ-2 составил ($2,3 \pm 0,1$) и ($2,1 \pm 0,2$) усл. ед. соответственно против ($0,6 \pm 0,1$) усл. ед. в контрольной группе. Повышенное содержание фермента демонстрирует наличие прямой корреляции между развитием поражений слизистой оболочки гастродуоденальной зоны и приемом НПВП ($p < 0,001$).

Yu.M. Stepanov, Yu.S. Breslavets

The assessment of the cyclooxygenase type 2 levels in the gastroduodenal mucosa in patients with NSAID-induced gastropathy

The article presents results of immune-histochemical investigation of cyclooxygenase type 2 (COX-2) levels in 28 patients with NSAIDs- induced gastropathy, who took nonselective non-steroidal anti-inflammatory drugs (aspirin, diclofenac) and in 16 patients with NSAIDs – induced gastropathy, who took selective COX-2 inhibitors (nimesulide, Movalis). To make the results more reliable, the study it included 20 people without endoscopically verified gastrointestinal pathology (GIP), which formed the control group. The mean COX-2 level was 2.3 ± 0.1 and 2.1 ± 0.2 conventional units, respectively, against 0.6 ± 0.1 conventional units in the control group. The increase of the enzyme levels demonstrates the direct correlation between the development of lesions of gastroduodenal mucosa and NSAIDs intake ($p < 0.001$).

Контактна інформація

Степанов Юрій Миронович, д. мед. н., проф., зав. кафедри
49074, м. Дніпропетровськ, просп. ім. Газети «Правда», 96
Тел. (56) 760-26-96

Стаття надійшла до редакції 5 жовтня 2010 р.