



Ю.М. Степанов, Ю.С. Бреславець
ДЗ «Дніпропетровська медична академія»

Вивчення вмісту eNOS та iNOS у слизовій оболонці гастродуоденальної зони у хворих на НПЗП-гастропатії до та після лікування

Ключові слова

НПЗП-гастропатія, eNOS (ендотеліальна синтаза оксиду азоту), iNOS (індуцибельна синтаза оксиду азоту), імунореактивні реакції, культура *Helicobacter pylori*.

Вивчення гастродуоденальних ускладнень, які виникають на тлі прийому нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), проводили, починаючи з 30-х років минулого століття. Вже на той час було доведено, що ацетилсаліцилова кислота (АСК) може провокувати ураження слизової оболонки шлунка (СОШ) з формуванням ерозій. А. Douthwait, J. Lintoff у 1938 р. опублікували в журналі *Lancet* дані про ендоскопічну картину «аспіринових» ерозій СОШ. Хоча у ті часи проблема НПЗП-гастропатій не була настільки актуальною, як нині, проведення подібних досліджень тривало впродовж усього періоду застосування цих препаратів [13].

На початку 1980-х епідеміологи з різних країн світу відзначили, що внаслідок поліпшення якості життя хворих з хронічним больовим синдромом (насамперед пацієнтів з ураженням опорно-рухової системи) через регулярне використання НПЗП підвищилася частота тяжких гастродуоденальних ускладнень. З'ясувалося, що хворі з цією патологією, які регулярно приймали НПЗП, помирали від шлунково-кишкових кровотеч та перфорації вдвічі частіше, ніж ті, хто не приймав ці препарати [3, 5, 8, 15].

За даними російських авторів, до 20-го року життя кожен другий житель Росії має те чи інше ревматичне захворювання, а до 65-го — практично всі. В Україні лише на остеоартроз хворіє 3,5 млн (2,2 %) населення, на ревматоїдний арт-

рит — 170 тис. (0,4 %). Актуальність проблеми остеоартрозу набуває важливого значення також у зв'язку зі зростанням тривалості життя людини. За прогнозами ООН, частка людей похилого віку в структурі населення збільшиться до 26,3 % у 2025 р. і до 38,1 % у 2050 р. [3, 8].

Ураження гастродуоденальної зони у вигляді ерозій виявляють у 10–20 % хворих, які отримували НПЗП, в 1–2 % з них розвиваються перфоративні виразки та кровотечі [6, 8].

У 1971 р. Дж. Вейн здійснив прорив у розумінні патогенезу НПЗП-гастропатій, установивши, що НПЗП знижують рівень тканинних простагландинів шляхом інгібування циклооксигенази (ЦОГ). Взаємодіючи практично з усіма мітохондріальними ферментами, ці препарати найбільше впливають на ЦОГ, різко пригнічуючи її активність [6, 11, 18]. Крім того, в останнє десятиріччя активно вивчають роль молекули оксиду азоту (NO) при ураженнях шлунково-кишкового тракту (ШКТ), зокрема при НПЗП-гастропатіях [1, 16, 17].

Сьогодні NO розглядають як перший представник нового класу сигнальних молекул, які виконують міжклітинну комунікацію і регуляцію багатьох функцій у різних тканинах та системах організму [2]. Ендогенний NO утворюється з амінокислоти L-аргініну, яка надходить у клітину за допомогою специфічного транспортуючого чинника, за участі ферменту, який каталізує

синтез NO, — NO-синтази (NOS). NO, який утворився, стимулює розчинну гуанілатциклазу, що спричиняє утворення циклічного гуанозинмонофосфату, який активує протеїнкінази і подальші внутрішньоклітинні реакції та ефекти в клітинах-мішенях [1, 4].

На даний час відомо, що синтази оксиду азоту представлені групою ферментів, які кодуються різними генами: NOS₁, NOS₂, NOS₃. Н. Schmidt та співавт. (1995) запропонували гіпотетичну модель та функції NOS і визначили, що NOS₁ (нейрональна), NOS₃ (ендотеліальна) належать до конституціональних ізоформ синтаз, а їхня активність прямо пропорційно залежить від збільшення вмісту внутрішньоклітинного кальцію. NOS₂ (макрофагальна) є індукцибельною формою синтаз, яка практично не пов'язана з кальцієм та активується під впливом імуногенних та прозапальних стимулів, продукується в сотні тисяч разів більшої кількості порівняно з конституціональними формами [7, 8, 10, 14].

Дослідженнями [7, 9] продемонстровано, що джерелом NO у ШКТ є епітелій, судинний ендотелій, гладенькі м'язи, базофіли, резистентні та інфільтративні лейкоцити (нейтрофіли та макрофаги), ентеральні нейрони.

Участь NO в розвитку захворювань шлунка і дванадцятипалої кишки (ДПК) підтверджено низкою експериментальних і клінічних досліджень [7].

I. Alican та співавт. [9] досліджували концентрацію NO у СОШ хворих на пептичну виразку, асоційовану з гелікобактерною інфекцією. Пацієнти з активною стадією виразкового процесу мали найбільшу концентрацію цього чинника, що дає підставу припустити його участь у ранній стадії репарації СОШ. Здатність NO контролювати мікроциркуляцію в шлунку робить його одним з чинників захисту СОШ. Нестача NO погіршує кровопостачання органа, що опосередковано позначається на секреторній функції шлунка і здатності СОШ протистояти впливу чинників агресії. Проте NO може бути агресивним чинником (при ураженні СОШ), підсилювати, наприклад, цитотоксичність пероксиду водню [7, 12]. Згідно з даними [7, 10, 16], надмірна експресія конституціональної NOS в ендотелії судин СОШ та надлишкова продукція NO розглядаються як важливі чинники зниження її резистентності до пошкодження.

Проведено дослідження, присвячені вивченню ролі NO при патології ШКТ, проте питання щодо впливу молекули NO на патологічний процес у хворих на НПЗП-гастропатії, зокрема залежно від селективності препарату, залишається відкритим.

Мета дослідження — вивчити вміст ферментів eNOS (ендотеліальної синтази оксиду азоту) та iNOS (індуцибельної синтази оксиду азоту) в слизовій оболонці гастродуоденальної зони при гастропатіях у хворих до та після лікування нестероїдними протизапальними препаратами залежно від селективності НПЗП та наявності інфекції *Helicobacter pylori*.

Матеріали та методи

Під наглядом перебували 52 пацієнти, з них 32 — із запальними та ерозивними ураженнями гастродуоденальної зони, виявленими ендоскопічно на тлі тривалого прийому з терапевтичною метою НПЗП (15 жінок та 17 чоловіків віком від 18 до 67 років), які склали основну групу, та 20 — без морфологічно верифікованої патології ШКТ, які не приймали НПЗП (7 жінок та 13 чоловіків віком від 18 до 67 років) — контрольна група. Обидві групи були порівнянними за віком ($p > 0,20$) і співвідношенням статей ($p > 0,30$).

Для участі у дослідженні відбирали хворих, які амбулаторно або стаціонарно лікувалися з приводу основного захворювання та приймали з терапевтичною метою НПЗП тривалий час (від 1 міс до 3 років). У 20 (63 %) пацієнтів основної групи діагностовано остеоартроз з вираженим больовим синдромом, зокрема деформуючий з порушенням функції суглобів 2–3 ступеня, у 12 — ревматоїдний артрит.

18 (56 %) пацієнтів мали скарги з боку ШКТ, їм було проведено фіброгастродуоденоскопічне дослідження (ФГДС) у плановому порядку. Решта хворих 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 1-ї групи (16 пацієнтів) приймали неселективні НПЗП («Аспірин», диклофенак), пацієнти 2-ї групи (16) — селективні інгібітори ЦОГ-2 (німесулід, «Моваліс»).

Ендоскопічне дослідження проводили за допомогою фіброгастроскопа PENTAX-FG-29; рН-метрію — за методом В.М. Чернобрового. Для проведення морфологічного дослідження біопсійний матеріал хворих, який отримували під час ФГДС, фіксували в 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну протягом 10–12 год з метою збереження цілісності клітин і тканин. Далі матеріал заливали у парафін згідно із загальноприйнятими методиками. Парафінові тонкошарові зрізи товщиною 3–5 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином за стан-

дартною методикою та піддавали мікроскопічному дослідженню за допомогою світлового мікроскопа Leica DMLS з використанням об'єктивів $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$. Тонкошарові парафінові зрізи інкубували з первинними антитілами у вологих камерах за температури 23–25 °C протягом 30 хв. Як первинні антитіла використовували спектр антитіл, який включав маркери eNOS і iNOS (LabVision, США). Вторинні антитіла, специфічно специфічнотропні до первинних, наносили на зрізи та інкубували у вологих камерах протягом 30 хв з промиванням у ТРИС-буферному розчині між етапами протягом 10 хв. Імуногістохімічне дослідження проводили з використанням системи візуалізації останнього покоління UltraVision LP (LabVision, США). Ідентифікацію реакції здійснювали при нанесенні хромогену діамінамінобензидину (DAВ) під контролем мікроскопа протягом від 20 с до 3 хв, з проявом у вигляді темно-коричневого забарвлення цитоплазми клітин.

Кількісні та якісні показники експресії маркерів вивчали як мінімум у 8–10 випадково обраних полях зору гістологічних зрізів при збільшенні $\times 400$ та $\times 1000$. Визначення рівня експресії eNOS та iNOS проводили імуногістохімічним методом по шкалі від 0 до 3 відповідно до рекомендацій Lazaraki G. та співавт. (2008): 0 – негативна реакція, 1 бал – слабе дифузне забарвлення, 2 бали – помірне гранулярне забарвлення, 3 – інтенсивне гранулярне забарвлення. Площу забарвлення визначали за відсотком забарвлених клітин до всієї площі тканини (< 10 %, 10–89 %, > 90 %). Таким чином, отримували сукупний показник 1 (+) (інтенсивність 1, площа 10–100 % забарвлених клітин, або інтенсивність 2–3, площа менше 10 % забарвлених клітин), 2 (++) (у діапазоні інтенсивності 2, понад 10 % забарвлених клітин, до інтенсивності 3, менш ніж 90 % забарвлених клітин), сукупний показник 3 (+++) (інтенсивність 3, понад 90 % забарвлених клітин).

Статистичну обробку матеріалів досліджень проводили з використанням пакета програм Statistica 6.1. Для оцінки достовірності відмінностей середніх величин застосовували критерії Стюдента, Манна – Уїтні, Вілкоксона, відносних величин – критерій відповідності Хі-квадрат, зокрема з поправкою Йейтса; для оцінки взаємозв'язку між окремими ознаками – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r). Дані представлено у вигляді середньої арифметичної (M), стандартної похибки середньої (m), медіани (Me), на рисунках – у вигляді M і 95 % довірчого інтервалу. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За результатами ФГДС, виразкову хворобу шлунка виявлено у 7 (43 %) хворих 1-ї групи і у 5 (31 %) – 2-ї ($p > 0,40$); виразкову хворобу дванадцятипалої кишки (ДПК) – у 3 (19 %) і 5 (31 %) відповідно ($p > 0,40$), активний ерозивний гастрит – у 6 (38 %) пацієнтів у кожній групі ($p > 0,99$) (рис. 1).

Для оцінки гелікобактерної інфекції та визначення можливого взаємозв'язку між наявністю цієї інфекції та селективністю обраного НПЗП усім пацієнтам проведено швидкий уреазний тест на наявність *H. pylori*.

За результатами тесту, інфікованість *H. pylori* становила у 1-й групі 62 % (10) хворих, у 2-й – 50 % (8), у контрольній – 50 % (10). Незважаючи на відсутність морфологічно верифікованої патології ШКТ у пацієнтів контрольної групи, за частотою обсіменіння *H. pylori* вона вірогідно не відрізнялася від основних груп дослідження ($p > 0,40$). Прямого взаємозв'язку між наявністю *H. pylori* та селективністю НПЗП не виявлено.

Дослідження імуногістохімічним методом вмісту синтаз NO (iNOS, eNOS) в основній і контрольній групах продемонструвало суттєве ($p < 0,001$) збільшення їхньої продукції при запальних та ерозивних ураженнях гастродуоденальної зони, спричинених прийомом НПЗП (рис. 2).

Таким чином, середні рівні показників у хворих основної групи в 2,2–6,8 разу перевищували такі у пацієнтів контрольної групи, що свідчить про наявність прямопропорційного зв'язку між розвитком патологічного процесу у слизовій оболонці гастродуоденальної зони та активністю синтаз NO. Водночас вірогідних відмінностей у вмісті різних форм NO залежно від селективнос-

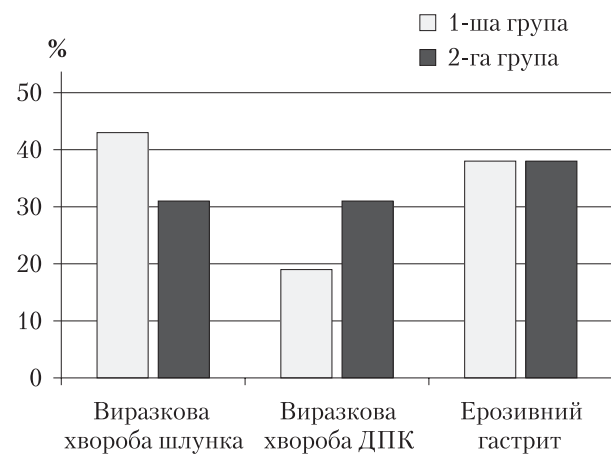


Рис. 1. Структура характеру уражень гастродуоденальної зони у хворих, залежно від селективності НПЗП

патології ШКТ ($p < 0,001$), що свідчить про безпосередній вплив цих ферментів на розвиток патологічного процесу при тривалому прийомі НПЗП.

Достовірне зниження імунореактивності eNOS та iNOS ($p < 0,01$) на тлі прийому терапії за схемою, яка включала пантопразол та ребаміпід, на відміну від використання лише інгібіторів протонної помпи, свідчить про участь синтазу оксиду азоту у розвитку НПЗП-гастропатій, імовірно, за рахунок зниження захисних властивостей слизової оболонки гастродуоденальної зони, порушення кровопостачання в ураженій ділянці.

Хворі з НПЗП-гастропатіями не відрізнялися за показником інфікованості *H. pylori*, однак спостерігалася тенденція до збільшення частоти виявлення інфекції *H. pylori* у пацієнтів з

НПЗП-асоційованими гастропатіями, що може свідчити про відсутність прямого зв'язку між наявністю бактерії *H. pylori* та ступенем селективності НПЗП ($p < 0,40$).

Значне зниження вмісту синтазу оксиду азоту після лікування ускладнень гастродуоденальної зони на тлі прийому НПЗП зафіксовано у хворих без гелікобактерної інфекції порівняно з особами, в яких було виявлено *H. pylori*.

Перспективи подальших досліджень. Продовження досліджень, спрямованих на вивчення патогенетичних механізмів, зокрема чинників агресії та резистентності слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки у хворих на НПЗП-асоційовані гастропатії. Розробка на цій підставі нових методів профілактики та комплексного лікування даної патології.

Список літератури

1. Брюне Б., Сандау К., Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути // Биохимия.— 2006.— Т. 63, № 7.— С. 966—975.
2. Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы // Биохимия.— 2006.— Т. 63, № 7.— С. 867—869.
3. Козлова И.В., Липатова Т.Е., Афонина Н.Г., Кветной И.М. Гастропатия, индуцированная НПВС, у больных остеоартрозом: роль некоторых факторов диффузной эндокринной системы желудка в ее возникновении // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.— 2006.— № 1.— С. 47—52.
4. Лазебник Л.Б., Дроздов В.Н., Барышников Е.Н. Роль оксида азота (NO) в патогенезе некоторых заболеваний органов пищеварения // Эксперим. и клин. гастроэнтерол.— 2005.— № 2.— С. 4—11.
5. Лапина Т.Л. Лечение и профилактика гастропатий, индуцированных нестероидными противовоспалительными средствами, в практике терапевта // РЖГТК.— 2009.— Т. 19.— № 4.— С. 13—18.
6. Насонов Е.Л. Специфические ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ) — 2, решенные и не решенные проблемы.— К. «Клин. фармакол. и терап.» М., 2000.— С. 57—64.
7. Сорокман Т.М., Андрійчук Д.Р., Сокольник С.В., Макарова О.В. Роль монооксида нітрогену в розвитку гастродуоденальної патології (огляд літератури) // Буков. мед. вісн.— 2009.— Т. 13, № 1 — С.137—138.
8. Степанов Ю.М., Бреславец Ю.С. Вміст синтазу оксиду азоту в слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки у хворих на НПЗП-гастропатії // Сучасна гастроентерол.— 2010.— № 6 (56).— С. 11—15.
9. Alican I., Cubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and disfunction // Am. J. Physiol.— 2006.— Vol. 91.— P. G225—237.
10. Dykhuizen R.S. Antimicrobial effect of nitric oxide on gut pathogens // Antimicrob. Agents. Chemother.— 2007.— Vol. 40.— P. 1522—1527.
11. Hippisley-Cox J., Coupland C., Logan R. 10. 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 // Br. Med. J.— 2005.— N 331.— P. 1310—1316.
12. Kuiken S.D., Vergeer M. Role of nitric oxide in gastric motor // Gut.— 2004.— Vol. 51.— P. 1242—1247.
13. Maiden L. et al. NSAID and bowel injury // Clin. Gastroenterol. Hepatol.— 2005.— N 3.— P. 55—59.
14. Saur D., Alesher H.D. Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract // Gastroenterol.— 2005.— Vol. 23.— P. 567—572.
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. Shan V., Gores G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease // Gastroenterology.— 2007.— Vol. 45.— P. 787—781.
17. Tomita R., Ikeda T. Nitric oxide in the colon in patients Nitric oxide Nitric oxide with slow-transit constipation // Dis. Colon. rectum.— 2006.— Vol. 45.— P. 593—600.
18. Vane J.R., Botting R.M. The future of NSAID therapy: selective COX-2 inhibitors // Clin. Pract.— 2000.— N 54.— P. 7—9.

Ю.М. Степанов, Ю.С. Бреславец

Изучение содержания eNOS и iNOS в слизистой оболочке гастродуоденальной зоны у больных при НПВП-гастропатиях до и после лечения

Приведены результаты иммуногистохимического исследования уровня индуцибельной и эндотелиальной синтазы оксида азота (iNOS и eNOS) у 32 пациентов с воспалительными и эрозивными поражениями желудка и двенадцатиперстной кишки на фоне длительного приема нестероидных противовоспалительных средств.

тельных препаратов (НПВП) до и после лечения поражений гастродуоденальной области. Средний уровень iNOS у больных с поражением гастродуоденальной зоны, вызванным приемом НПВП, снизился в 5,2 раза после лечения по схеме, включающей пантопразол и ребамипид, и в 32,7 раза при использовании только ингибитора протонной помпы, eNOS — соответственно в 5,6 и 37,5 раза. Установлено прямую корреляционную связь между уровнем содержания iNOS, eNOS и поражениями слизистой оболочки гастродуоденальной зоны при НПВП-гастропатиях ($p < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о снижении защитных свойств слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки при длительном приеме НПВП.

Yu.M. Stepanov, Yu.S. Breslavets

Comparative assessment of eNOS and iNOS levels in gastroduodenal mucosa in patients with NSAID gastropathy before and after treatment

The article presents results of immune-histochemical investigation of the levels of of inducible and endothelial oxide synthases (iNOS and eNOS) in 32 patients with inflammatory and erosive damages of the stomach and duodenum against the long-term use of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) before and after treatment of the damages of gastroduodenal mucosa. The mean iNOS level in patients with NSAID gastropathy decreased in 5.2 times and consisted 2.44 ± 0.17 before and 0.47 ± 0.11 after the treatment in accordance with the scheme that included Pantoprazole and Rebamipid, and decreased in 32.7 times in the case of PPI use; the eNOS levels decreased in 5.6 and 37.5 times accordingly. The direct correlation has been established between the levels of iNOS and eNOS and damages of gastroduodenal mucosa at NSAID gastropathy ($p < 0.001$). The obtained data shows the attenuation of protective functions of the gastroduodenal mucosa at the long-term intake of NSAIDs.

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 29 грудня 2011 р.