

Смирнова Елизавета Александровна

**ИНФОРМАТИВНОСТЬ ПРОТЕОМНОГО
ПРОФИЛИРОВАНИЯ В ПРОГНОЗЕ ТЕЧЕНИЯ
ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ
БОЛЕЗНИ**

14.01.04 – внутренние болезни

Автореферат

диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: Тарасова Галина Николаевна

доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Корочанская Наталья Всеволодовна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры хирургии № 3 ФПК и ППС, руководитель гастроэнтерологического центра Краевой клинической больницы № 2, главный внештатный гастроэнтеролог Министерства здравоохранения Краснодарского края и Южного Федерального округа;

Бордин Дмитрий Станиславович, доктор медицинских наук, доцент, государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С.Логина Департамента здравоохранения г. Москвы», заведующий отделом патологии поджелудочной железы, желчных путей и верхних отделов пищеварительного тракта, профессор кафедры общей врачебной практики (семейной медицины) ФДПО, интернатуры и ординатуры ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения России, главный внештатный специалист гастроэнтеролог Департамента здравоохранения города Москвы.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации (ФГБУ ДПО «ЦГМА» УД Президента РФ).

Защита состоится «03.» декабря 2018г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.082.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России и на сайте: www.rostgmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук
доцент

Джериева Ирина Саркисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в диагностике и терапии кислотозависимых заболеваний, работы, посвященные гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ), сохраняют свою актуальность ввиду растущей распространенности, рефрактерности на фоне кислотосупрессивной терапии и высоких рисков осложненного течения заболевания [Бордин, Д.С., 2011; Морозов, С.В., 2010; Корочанская, Н.В., 2016; El-Serag, H.V., 2014; Gad El-Nak, N.A., 2007; Havemann, B.D., 2007; Herbella, F.A., 2015]. Так, по данным систематического обзора, посвященного эпидемиологии ГЭРБ, отмечается рост распространенности заболевания с 1995 года, особенно в странах Северной Америки и Восточной Азии [El-Serag, H. V., 2014]. Результаты исследования Frazzoni L. et al. (2017) указывают на первостепенный вклад прогрессирования ГЭРБ в пищевод Барретта (ПБ), резистентности к терапии ингибиторами протонной помпы (ИПП), составляющей около 30% [Frazzoni, L., 2017]. На сегодняшний день известно, что ПБ является факультативным предраковым состоянием, увеличивающим риск развития аденокарциномы пищевода (АКП) в 30-125 раз по сравнению с общей популяцией, при этом вероятность злокачественной трансформации ПБ варьирует в пределах 0,5-2,1% [Desai, T.K., 2011; Rubenstein, J.H., 2014; Terry, P., 2000]. В соответствии с современными представлениями ГЭРБ является полиэтиологичным заболеванием со сложным патогенезом, включающим повреждающее действие рефлюктата, нарушения моторики на уровне пищевода и желудка, а также измененную чувствительность слизистой оболочки (СО) пищевода [Бордин, Д.С., 2012; Ивашкин, В.Т., 2010; Biljana, J., 2016; McQuard, K.R., 2011; Pawlik, M.W., 2014]. Кроме этого, в ряде исследований подчеркивается роль изменений белковой экспрессии при разных формах ГЭРБ и градациях рефлюкс-эзофагита (РЭ) [Колесов, С.А., 2014; Breton, J., 2008; Calabrese, C., 2011; Liu, N., 2013; Zhao, J., 2007]. В связи с растущими возможностями современных методологических

подходов молекулярной медицины представляют интерес работы с использованием постгеномных технологий, позволяющих выяснить ранее неизвестные механизмы развития целого ряда заболеваний. Установлено, что большинство патологических изменений в клетках и тканях отдельных органов характеризуются отклонением от физиологического белкового профиля организма здорового человека. Идентификация выявленных белков с помощью современных биоинформационных подходов, изучение их физиологических функций, а также анализ изменений при различных заболеваниях и ответ на проводимую терапию являются основными задачами протеомики. Кроме того, методы сравнительной протеомики позволяют выявить белковые предикторы заболевания и новые «мишени» для таргетной терапии. При ГЭРБ, в целом, картина изменений в протеоме СО пищевода остается малоизученной, хотя потребность в дополнительных молекулярных маркерах, которые могли бы фактически отражать ее состояние и определять объективный прогноз развития заболевания, высока [Calabrese, C., 2011; Shao-Bin, Y., 2017; Zhao, J., 2015]. В представленных работах получены довольно разнородные и противоречивые данные о белковом паттерне у пациентов с осложненным течением заболевания - ПБ, что не позволяет сделать выводы о динамике изменений белкового профиля у пациентов с разными формами ГЭРБ и градациями РЭ.

Таким образом, широкая распространенность, большая социально-экономическая значимость заболевания диктуют необходимость дальнейшего изучения патогенетических механизмов развития ГЭРБ и оптимизации ее диагностики, используя для этого постгеномные технологии.

Цель исследования

Установление клинико-патогенетического и диагностического значения протеомного дисбаланса в слизистой оболочке пищевода при ГЭРБ.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать протеомный профиль СО пищевода у здоровых лиц.
2. Изучить протеомный профиль СО пищевода при разных формах ГЭРБ и градациях РЭ.

3. Сопоставить протеомный профиль СО пищевода при неосложненном и осложненном течении заболевания – ПБ.
4. Провести морфофункциональную оценку состояния эпителия и собственной пластинки СО пищевода у больных с тяжелым и осложненным течением ГЭРБ, определив характер экспрессии молекул клеточной адгезии - E-кадгерина.
5. Определить патогенетическую роль выявленных протеомных маркеров в развитии ГЭРБ и оценить их диагностическую (прогностическую) значимость в предикции характера течения болезни.

Научная новизна

Впервые выявлены и проанализированы в сравнительном аспекте специфические особенности протеомного спектра СО пищевода при ГЭРБ в зависимости от преобладающего характера рефлюктата.

Впервые в качестве диагностических маркеров развития ПБ предложен белковый паттерн, представленный статмином 1, тиоредоксином, белком теплового шока 60-kDa, элонгационным фактором Tu, инорганической пирофосфатазой. Полученные результаты углубляют представления о молекулярных механизмах развития тяжелого и осложненного течения ГЭРБ.

Впервые установлено, что экспрессия E-кадгерина при ГЭРБ, имеющая однонаправленную динамику изменений в зависимости от градации РЭ и характера рефлюктата, может служить потенциальным фактором прогнозирования тяжести течения заболевания.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Расширены теоретические представления о механизмах формирования повреждения СО пищевода при ГЭРБ и ее прогрессировании. Установлены белковые композиции в СО пищевода, характеризующие разные градации РЭ. Определен белковый паттерн СО пищевода при осложненном варианте течения заболевания - ПБ. Биоинформационными методами проанализированы и реконструированы специфичные межбелковые взаимодействия при ГЭРБ, а также патобиохимические пути развития патологии пищевода на уровне клетки

с участием обнаруженных в исследовании белков.

Материалы и результаты исследования применяются в учебном процессе на кафедре пропедевтики внутренних болезней, факультете повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов РостГМУ (кафедра гастроэнтерологии и эндоскопии с курсом клинической фармакологии ФПК и ППС). Результаты работы внедрены в практику отделения гастроэнтерологического клиники РостГМУ, гастроэнтерологической службы МБУЗ ГБ №8 г. Ростова-на-Дону.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа является прикладным научным исследованием, основанном на общенаучных подходах и решающим проблему расширения представлений о патогенетических механизмах развития и прогрессирования ГЭРБ. Объект исследования: пациенты с разными формами ГЭРБ и градациями РЭ, а также с осложненным течением заболевания - ПБ.

Все больные были обследованы в соответствии с Национальными рекомендациями по диагностике и лечению ГЭРБ (2017). Диагноз ГЭРБ верифицирован с использованием клиничко-анамнестических данных, результатов тестового опросника GerdQ, инструментальных методов обследования: видеоэзофагогастродуоденоскопии с детальным осмотром дистального отдела пищевода (режим NBI), хромовидеоэзофагоскопии с витальным красителем (4% раствор Люголя), биопсией и морфологическим исследованием эзофагобиоптатов; [24-часовой внутрипищеводной рН-импедансометрии](#); рентгеноскопии пищевода и желудка с дополнительными нагрузочными тестами (Вальсальва, Тредленбурга).

Предварительное фракционирование образцов СО пищевода выполняли с использованием магнитных микрочастиц с различными поверхностями (MB-NIC C8, MB-IMAC Cu, MB-WCX), согласно методике производителя (Bruker Daltonics, Германия). Профилирование протеома проводили на времяпролетном тандемном MALDI-масс-спектрометре Ultraflex II. Каждый масс-спектр был проанализирован с помощью программ FlexAnalysis 3.0 и ClinProTools 2.1

(Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию белков и пептидов проводили с помощью баз данных NCBI и SwissProt / UniProt с использованием программы Mascot Search (v2.1, Matrix Science, Великобритания). Результаты идентификации белков принимались как достоверные при уровне значимости не менее 95% и показателе сиквенс-покрытия не менее 60%.

Иммуногистохимическое исследование эзофагобиоптатов проводилось стрептавидин-биотиновым методом с использованием моноклональных мышинных антител к E-кадгерину (Dako, США). Экспрессия E-кадгерина оценивалась полуколичественным методом от 0 до 3 баллов (+++) в покровном эпителии кардиального отдела, многослойном плоском эпителии, в железах и в зонах кишечной метаплазии. Количественно изучаемый маркер измерялся в условных единицах оптической плотности (УЕОП) с помощью аппаратно-программного комплекса - инвертированного микроскопа Leica DM108 и моторизованного микроскопа Leica DM6000 в программе Leica Applicationsuite Version 4.6.

Статистический анализ данных проводился средствами встроенного прикладного пакета модулей программы «STATISTICA 10.0 for Windows» (StatSoft, USA).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Использование сравнительного протеомного и биоинформационного анализа позволяет выявить белки, ассоциированные с ГЭРБ и развитием ее осложненного течения.
2. Разные градации РЭ отличаются протеомным спектром СО пищевода и характеризуются как появлением дополнительных белков отличия, так и отсутствием ряда белков по сравнению с неизменной тканью пищевода.
3. Белковый паттерн, идентифицированный для ПБ, позволяет использовать его в качестве прогностического маркера формирования осложненного течения ГЭРБ.

4. Характер рефлюктата влияет на модификацию протеомного спектра СО пищевода и молекулы клеточной адгезии - E-кадгерина, что создает предпосылки для внесения дополнений в протоколы терапии ГЭРБ.

Степень достоверности результатов

Обоснованность и статистическая значимость полученных результатов обеспечена достаточным объемом выборки для клинико-инструментальной и морфологической верификации диагноза и оценки течения ГЭРБ, использованием современных постгеномных методик, применением адекватных методов математической обработки полученных результатов.

Личное участие автора

Личное участие автора осуществлялось на всех этапах выполнения настоящего исследования и включало отбор пациентов и проведение их клинического обследования, первичную обработку и систематизацию полученного материала, статистический анализ результатов и их введение в научный оборот путем написания статей в профильных журналах и выступлений на научно-практических конференциях, разработку «Способа диагностики пищевода Барретта у больных с осложненным течением гастроэзофагеальной рефлюксной болезни» и внедрение его в клиническую практику.

Апробация результатов исследования и публикации

Апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедры пропедевтики внутренних болезней и научно-координационного совета «Научно-организационные основы профилактики, диагностики и лечения основных заболеваний внутренних органов» ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 8 от 30.08.2018 г.).

Основные положения диссертации представлены на IV, VI Межрегиональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Интернист» (Ростов-на-Дону, 2015, 2017), 21-ой объединенной Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2015), IV Съезде терапевтов Южного Федерального округа (Ростов-на-Дону, 2015),

Третьей итоговой научной сессии РостГМУ (Ростов-на-Дону, 2016), VII Латвийском гастроэнтерологическом конгрессе с международным участием (Рига, 2016), 22-ой объединенной Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2016), Четвертой итоговой научной сессии РостГМУ (Ростов-на-Дону, 2017), VIII Латвийском гастроэнтерологическом конгрессе с международным участием (Рига, 2017). По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 журнальные статьи в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации. Получен патент на изобретение № 2655807 «Способ диагностики пищевода Барретта у больных с осложненным течением гастроэзофагеальной рефлюксной болезни».

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 46 таблиц, иллюстрирована 18 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, приложения. Указатель литературы включает в себя 327 источников, из них 62 отечественных и 265 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Клиническая характеристика обследованных больных

В исследование включено 145 пациентов с ГЭРБ (89 - женщин и 59 - мужчин), в возрасте 19-75 лет (средний возраст $48 \pm 14,2$ лет) и 15 пациентов с ПБ (5 - женщин и 10 - мужчин), средний возраст $46,2 \pm 15$ лет. Критериями включения в протокол исследования являлись: амбулаторные и стационарные больные с диагнозом ГЭРБ и ПБ, в возрасте от 16 до 75 лет, обоего пола, подписавшие информированное согласие для участия в клиническом исследовании. Критериями исключения из проводимого исследования служили: беременные, кормящие грудью женщины; наличие злокачественных новообразований разной локализации в настоящее время или в анамнезе; клинически значимые отклонения клинических и лабораторных показателей от

нормы, выраженная органическая патология печени, легких, почек; заболевания сердечно-сосудистой системы, включая верифицируемую ЭКГ маркерами ишемическую болезнь сердца; отказавшиеся от дополнительного обследования, входящего в протокол исследования. Протокол исследования одобрен локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Ранжирование больных с разными формами ГЭРБ на группы проводилось в соответствии с классификацией Савари-Миллер, при выявлении ЭЭ - Лос-Анджелесской классификацией [Dent, J., 2008]. На основании комплексного обследования больных было сформировано 4 группы. I группа - 52 больных с неэрозивной формой рефлюксной болезни (НЭРБ) и 39 пациентов с катаральным эзофагитом (КЭ), II (средне-тяжелые формы заболевания) - с градацией РЭ А и В (20 и 15 пациентов соответственно), III - 14 пациентов с градацией РЭ С и 5 пациентов с градацией РЭ D, IV (осложненное течение) - 15 пациентов с ПБ. Контрольную группу составили 20 практически здоровых добровольцев.

Результаты и обсуждение

Белковый паттерн слизистой оболочки пищевода в группе контроля и у пациентов с ГЭРБ

В настоящем исследовании изучены белковые композиции и вариабельность протеома СО пищевода у 45 пациентов с ГЭРБ и в группе 20 здоровых добровольцев. В качестве материала для исследования был выбран сегмент пищевода с максимально выраженными воспалительными изменениями СО. Изучению подвергались белки, экспрессируемые с частотой более 60%, а также редко встречающиеся белки, специфичные для изучаемых групп. В ходе исследования был идентифицирован 61 белок, для 57 из них определена тканевая принадлежность. Из числа идентифицированных белков в группе добровольцев тканевая принадлежность к пищеводу выявлена для 4-х: в их числе корнулин, муцин 21, 22, кальпаин 14, играющих ключевую роль в

поддержании функции преэпителиального и эпителиального барьера СО пищевода [Contzler, R, 2005; Yilchi, I.,2008]. Также, в этой группе были идентифицированы 11 часто экспрессирующихся белков, преимущественно локализованных во внутриклеточном пространстве: муцин 21, 22, кератин 6С тип 2, кальпаин 14, кератин 4 тип 2, кератин 13 тип 1, корнулин, транглутаминазы 1, 3, инсулиноподобный фактор роста 1, пролин обогащенный белок 1 α (табл. 1).

Таблица 1

Протеомный профиль слизистой оболочки пищевода
в группе здоровых добровольцев

Название белка	Субклеточная локализация	Процесс, в котором участвует белок	№ в базе Swiss-Prot
Муцин 22; 21	Мб	Резистентность СО пищевода на преэпителиальном уровне	E2RYF6, Q5SSG8
Кератин 6С, тип 2; Кератин 4, тип 2; Кератин 13, тип 1	ВП	Обеспечение межклеточной структурной целостности	P02538; P19013; P13646
Кальпаин 14	ВП	Связывание ионов кальция	A8MX76
Корнулин	ВП	Регуляция клоногенности клеточных линий пищевода	Q9UBG3
Трансглутаминаза 1;3	ВП	Катализирует связывание белков	Q08188; P22735
Пролин обогащенный белок 1 α	ВП	Дифференцировка кератиноцитов	P35321
Инсулиноподобный фактор роста 1	В	Стабильность интегринов	P05019

Примечание: ВП - внеклеточное пространство; Мб - мембрана, В - вакуоль

Оценка возраст-зависимых изменений протеома СО пищевода показала статистически значимое возрастание среднего количества белков с увеличением возраста пациентов ($R^2=0,78$). В настоящем исследовании проанализирован белковый спектр в разных отделах СО пищевода (табл. 2). В эзофагобиоптатах проксимальной части пищевода установлен 21 белок, при этом повышенная экспрессия (более 60%) со статистически значимыми различиями частоты встречаемости белка в двух сегментах пищевода отмечена

для α 1-кислого гликопротеина ($p=0,009$) и кальмодулина ($p=0,001$). В дистальной части СО пищевода аналогичные результаты получены для периплакина ($p=0,00004$), белка теплового шока 90 ($p=0,0009$). Установлены белки, встречающиеся с частотой более 60% в эзофагобиоптатах как проксимальной, так и дистальной частей пищевода: γ -цепь фибриногена и корнулин. Учитывая тот факт, что основной мишенью при ГЭРБ является СО дистального отдела пищевода, в дальнейшем исследовали эзофагобиоптаты из этого отдела.

Таблица 2

Протеомный профиль слизистой оболочки пищевода у больных с ГЭРБ

Название белка	Частота встречаемости		Локализация белка	Эффекты белка	№ в базе Swiss-Prot
	в/З	н/З			
γ цепь фибриногена $p=0,024$	94%	50%	ВП	Связывание молекул адгезии белков	P02679
α -1-кислый гликопротеин $p=0,009$	93%	42%	ВП	Белок острой фазы, регулятор иммунного ответа	P02763
Корнулин $p=0,08$	82%	50%	Ц	Регуляция эпителиальной дифференцировки, адгезии межклеточной	Q9UBG3
Кальмодулин 1 $p=0,001$	84%	17%	Ц	Ингибитор активности Ca^{2+} каналов, регулятор апоптоза, воспаления	P0DP23
Периплакин $p=0,00004$	8%	92%	Я, Ми	Связывание кадгеринов, структурный компонент цитоскелета	O60437
Протимозин α $p=0,009$	8%	58%	Я	Регуляция пролиферации	P06454
Белок теплового шока 90* $p=0,0009$	7%	74%	Мб	Регулятор АТФ-азной активности	P07900

Примечание: ВП - внеклеточное пространство; Ц - цитоплазма; Мб - мембрана, Ми - митохондрии; Мк - межклеточные контакты; Я - ядро

p - уровень статистической значимости частоты встречаемости белков в проксимальном и дистальном сегментах; $p<0,05$ - различие статистически значимо; $p<0,10$ - имеет место тенденция различия; $p>0,1$ - различие статистически незначимо.

Протеомный профиль при НЭРБ и КЭ был представлен 24 протеомными профайлами, при этом экспрессия более 60% выявлена для белка теплового

шока 90, аннексина A1, периплакина, α -1 кислого гликопротеина 1, основными функциями, которых являются поддержание целостности белковых структур и межклеточной адгезии, связывание РНК. Следует особо отметить протимозин α (PTMA, 12,2 kDa), выявляющийся у 45% обследованных пациентов. Известно, что он принимает участие в ответе клеток на окислительный стресс, способствуя активации экспрессии защитных генов, а также регулирует процессы пролиферации в СО пищевода [Huang, H.C., 2002;].

При РЭ А установлена высокая степень разнородности идентифицированных белков, что, возможно, объясняется повреждением целостности СО пищевода. Выраженная экспрессия выявлена для миоглобина, галектина 7, γ цепи фибриногена. Изменение продукции установлено также для карбонангидраз 1, 3 (CA1, 3, 28,8 kDa и 29,5 kDa), кальдесмона 1 (CALD1, 93,2 kDa), белков, обеспечивающих структурную целостность эпителиального барьера, регулирующих направленную миграцию лейкоцитов в тканях при воздействии рефлюктата на СО пищевода и также, поддерживающих в них кислотно-основное равновесие [адаптировано из база данных NCBI]. Белковый состав в СО пищевода у пациентов с РЭ В был практически аналогичен таковому в группе РЭ А. Таким образом, анализ белкового спектра у пациентов с легкими и среднетяжелыми формами РЭ позволяет высказать предположение о доминировании белковых паттернов, ответственных за поддержание резистентности СО пищевода посредством ремодуляции пролиферации и апоптоза.

У пациентов с РЭ градации С выявлено 13 белков с более значимой экспрессией периплакина, статмина 1, проколлаген пролина, аденилат-киназы 1, белка S 100 A9, белка теплового шока 90, ингибитора миграции макрофагов. Обращают внимание следующие биологические функции белков. Механизм действия статмина 1 (STMN 1, 17,2 kDa) тесно связан с процессами клеточной пролиферации, адгезии клеток и экстрацеллюлярного матрикса через интегрины, способствуя хромосомной нестабильности [Han, G., 2017; Wang, F., 2014]. Идентифицированный ингибитор миграции макрофагов (MIF, 32,6 kDa)

участвует в инактивации транскрипционного фактора p53, приводя к торможению процессов апоптоза поврежденных клеток в местах эрозий, а в последующем, и к неконтролируемому клеточному росту, что, возможно, является одним из пусковых факторов в каскаде пищеводного канцерогенеза. Практически аналогичный протеомный паттерн, выявленный при градации РЭ D, характеризовался преобладанием эпидермального белка, связывающего жирные кислоты, кальмодулина 1, статмина 1, протимозина α , α -1 кислого гликопротеина, кальпонина, миоглобина, а также γ цепи фибриногена, что, вероятно, связано с единым механизмом повреждения СО пищевода. Увеличение зоны повреждения, имеющее место при РЭ D, нередко сопровождается сосудистыми тромбозами, что объясняет экспрессию γ цепи фибриногена и неконтролируемую активацию апоптоза белком теплового шока 90, а также репаративную пролиферацию (протимозин α). Антагонистическим действием в отношении белка теплового шока 90 обладает белок S100 A9, основной функцией которого является контроль апоптоза [Fan, N.J., 2013].

Анализ белкового профиля СО пищевода в зависимости от преобладающего состава рефлюктата позволил установить, что в группе пациентов с преимущественно кислым рефлюксом имеет место экспрессия кальпонина 1 и цистатина А, направленная на поддержание целостности цитоскелета через десмосомы СО пищевода и активацию апоптоза в отношении поврежденных клеток. В основе действия щелочного рефлюктата лежат процессы гипоксии, что подтверждается экспрессией белка 1, стимулируемого гипоксией, прохибитина 2, тиоредоксина, при этом гипоксия позиционируется как туморогенный фактор с высоким онкогенным потенциалом. Кроме этого, компоненты дуоденального содержимого оказывают деструктивное действие на Е-кадгерины, сопровождающееся экспрессией винкулина. У пациентов с верифицированным ПБ экспрессируются 23 белка, из которых существенный уровень статистической значимости установлен для 6-ти: инорганической пирофосфатазы, статмина 1, элонгационного фактора Tu, белка теплового шока 60, тиоредоксина. Характеристика биологических функций

идентифицированных белков детализирует представления о механизмах формирования ПБ. Известно, что экспрессия статмина 1 сопряжена с высоким риском дисплазии за счет дестабилизации микротрубочек, при этом индуктором апоптоза выступает белок теплового шока 60 (HSPD1, 57,9 kDA) - молекулярный шаперон, который участвует в фолдинге и сборке белков митохондрий, облегчая протеолитическую деградацию свернутых полипептидов [Faried, A., 2004].

Таблица 3

Сравнительный анализ частоты встречаемости белков в слизистой оболочке пищевода в зависимости от тяжести ГЭРБ

Белки	Группы наблюдения (частота выявления, %)			Уровень статистической значимости различия частот в соответствующих группах наблюдения		
	I	II	III	I - II	I - III	II - III
α 1 кислый гликопротеин	38,6%	55,5%	26%	>0,1	>0,1	0,039
Аннексин А 1	58,6%	0	25%	0	0,012	0
Белок S 100 A9	18,1%	44,4%	0	0,05	0	0
Белок теплового шока 60	18,1%	25%	66%	>0,1	0,022	0,037
Белок теплового шока 90	71,8%	33,3%	33%	0,06	0,034	>0,1
Галектин 7	60%	20%	0	0,04	0	0
Кальпонин 1	9%	60%	0	0,003	0	0
Элонгационный фактор Tu	0	20%	67%	0	0	0,002
Эпидермальный белок, связывающий жирные кислоты	9,1%	88%	0	0,0001	0	0
Кальмодулин 1	13,6%	55,5%	31%	0,002	>0,1	>0,1
Миоглобин	36,3%	60%	0	0,02	0	0
Периплакин	71,8%	44,4%	60%	>0,1	>0,1	>0,1
Цепь тропомиозина 1	13,6%	20%	50%	>0,1	0,02	>0,1
Регуляторная легкая цепь 2 миозина	9%	0	50%	0	0,007	0
Статмин 1	13,6%	77,7%	70%	0,0003	0,001	0
Тропомиозин 2	31,8%	20%	45%	>0,1	>0,1	>0,1
Протимозин α	45,4%	55,5%	0	0,05	0	0

Примечание: I –легкое течение ГЭРБ, II – среднетяжелое и тяжелое течение ГЭРБ, III – пищевод Барретта; $p < 0,05$ - различия статистически значимы.

Тиоредоксин (TXN, 11,5 kDA) регулирует активность ферментов: апоптоз сигнал-регулирующей киназы 1, протеинкиназы ϵ , α , δ , ϵ и ζ [Pawlik, M.W., 2014], усиливает процессы гипоксии и ангиогенеза, способствуя выработке белка 1, стимулируемого гипоксией [адаптировано из базы данных NCBI]. Элонгационный фактор Tu (EEF1A1, 45 kDA) - мономерный белок, обеспечивающий процесс элонгации трансляции и организации митотического аппарата. Инорганическая пирофосфатаза (ENPP1, 32.6 kDA), играет решающую роль в липидном обмене (включая синтез и деградацию липидов), в синтезе ДНК, имеет проонкогенный потенциал ввиду высокой потребности раковых клеток в фосфатах [Chan, Xu., 2011]. Наряду с ней, член 10 семейства альдокеторедуктаз 1 (AKR1B1 0,35 kDA), участвующий в метаболическом пути ретиноевой кислоты, негативно-регулирующий апоптоз, приводящий к гипоксии, рассматривается как ведущий проонкогенный компонент [Breton, J., 2008]. Сравнительный анализ частоты встречаемости установленных белков при разных градациях РЭ и ПБ подтверждает прогрессию повреждения СО пищевода при ГЭРБ (табл. 3). В работе показано, что комбинация белков: белок теплового шока 60, кальпонин 1, элонгационный фактор Tu, эпидермальный белок, связывающий жирные кислоты, статмин 1, статистически значимо отражает динамику изменений в СО пищевода.

Таблица 4

Уровень экспрессии E-кадгерина
у больных с пищеводом Барретта в зависимости от характера рефлюктата

Субстрат исследования	Экспрессия E-кадгерина (УЕОП)		p
	ПБ		
	ПБК	ПБЦ	
Многослойный плоский эпителий	69,1±5,5*	38,5±5,0*	0,02
Покровный железистый кардиального типа	49,2 ±9,2*	36,4±12,5*	0,17
Кишечная метаплазия	59,9±14,5	28,6±2,7	0,008

Примечание: * статистически значимое различие экспрессии E- кадгерина между больными ПБ и нормой; p - уровень статистической значимости экспрессии E-кадгерина в сравниваемых группах; p<0,05 - различие статистически значимо

Сравнение экспрессии E-кадгерина у пациентов с ПБ проведено в многослойном плоском и покровном железистом эпителии, а также в элементах кишечной метаплазии.

Таблица 5

Сравнительный анализ экспрессии основных компонентов протеома у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью

Биологическая роль белков	Группы больных											
	I				II				III			
	v1	v2	v1/2	p	v1	v2	v1/2	p	v1	v2	v1/2	p
Развитие и рост органов и тканей	0,2	0,1	2,3	0,007	0,6	0,1	6,7	0,000006	0,2	0,1	1,9	0,32
Иммунная система	0,4	0,1	3,1	0,0004	0,3	0,1	2,7	0,001	0,2	0,1	1,7	0,18
Внутриклеточные процессы	0,2	0,12	2,3	0,00002	0,2	0,1	1,6	0,4	0,3	0,1	2,4	0,004
Рост и развитие клеток	0,2	0,1	1,5	0,05	0,3	0,1	1,9	0,002	0,5	0,1	3,2	0,00001
Клеточная подвижность	0,2	0,10	2,1	0,01	0,20	0,1	1,9	0,49	0,4	0,1	4,3	0,0001
Клеточная адгезия, взаимодействия	0,1	0,1	0,9	0,94	0,3	0,1	2,0	0,18	0,003	0,1	0,0002	-
Метаболизм и каскады сигнальных путей молекул	0,2	0,1	2,0	0,0007	0,4	0,1	4,	0,0005	0,3	0,1	2,8	0,0004
Ответ на стимул, передача и регуляция сигнала	0,5	0,2	2,0	0,003	0,5	0,2	1,8	0,02	0,3	0,2	1,2	0,3
Белки, организующие цитоскелет, мышечное сокращение	0,2	0,01	11,0	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-
Участие в воспалении	0,4	0,34	3,0	0,003	0,5	0,3	1,4	0,07	0,2	0,3	1,7	0,0004

Примечание: I группа-легкое течение; II группа- среднетяжелое и тяжелое; III группа-ПБ; v_1 - частота встречаемости белков с данной биологической ролью в группе больных с конкретной степенью тяжести заболевания; v_2 - частота встречаемости белков с данной биологической ролью во всем протеоме; v_1/v_2 – отношение частот встречаемости белков, p - достоверность ассоциации; $p < 0,05$ - ассоциация роли при данной степени тяжести болезни статистически значима; $0,05 < p < 0,1$ - имеет место тенденция ассоциации роли при данной степени тяжести болезни; $p > 0,1$ - ассоциация роли при данной степени тяжести болезни статистически незначима.

Зарегистрировано 2-кратное снижение экспрессии E-кадгерина, составившее $69,11 \pm 5,52$ УЕОП, у пациентов группы ПБ с кислым рефлюксом, при щелочном характере рефлюктата, снижение составило, в среднем по группе, $38,52 \pm 5,01$ УЕОП ($p=0,02$), что, практически в 3,5 раза, было ниже, чем в группе здоровых. В зонах кишечной метаплазии в группе с кислым рефлюксом зарегистрировано снижение экспрессии E-кадгерина до $59,98 \pm 14,50$ УЕОП, а при щелочном характере рефлюктата, мембранная экспрессии E-кадгерина была минимальная – $28,59 \pm 2,66$ УЕОП (табл. 4).

Таким образом, при ГЭРБ модифицируется экспрессия более 57 аннотированных белков протеома, условно классифицируемых по ведущему направлению действия на ряд групп (табл. 5). Следует подчеркнуть, что часть установленных белков выполняет существенно различные биохимические функции, но в работе мы указали преимущественно ассоциированные с повреждением пищевода. Полученные результаты дополняют современные представления о патогенезе ГЭРБ и создают теоретическое обоснование для внесения дополнений в существующий протокол диагностики и лечения этой категории пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Протеомный профиль СО пищевода у здоровых лиц характеризуется наличием 11 часто экспрессирующихся белков: муцина 21, 22, кератина 6 С тип 2, кальпаина 14, кератина 4 тип 2, 13 тип 1, корнулина, транглутаминаз 1, 3, инсулиноподобного фактора роста 1, пролин обогащенного белка 1а, которые,

преимущественно, осуществляют свои функции во внутриклеточном пространстве.

2. Биоинформационный анализ протеомных данных показал, что основной функцией большинства белков, выявленных в группе здоровых добровольцев, является поддержание состоятельности преэпителиального уровня защиты СО пищевода, регуляция пролиферативной активности, обеспечение связей между белками межклеточных контактов и контроль клеточного цикла.

3. Сравнительный анализ белкового профиля дистальной и проксимальной частей пищевода у больных с ГЭРБ позволяет предположить диффузную реакцию СО на повреждающее действие рефлюктата, при этом в дистальной части функции большинства белков направлены на реализацию противовоспалительного ответа, а в проксимальной - на поддержание целостности цитоскелета.

4. При НЭРБ экспрессия более 60% была выявлена для белка теплового шока 90, аннексина А1, периплакина, $\alpha 1$ кислого гликопротеина 1. Идентифицированные белки поддерживают целостность межклеточных контактов, катализируют апоптоз поврежденных клеток, способствуя регенерации СО пищевода, и оказывают противовоспалительное действие в ответ на длительную экспозицию рефлюктата.

5. Протеомный спектр при низких градациях РЭ характеризуется наличием белков: миоглобина, галектина 7, γ цепи фибриногена, при высоких градациях появлением дополнительно следующих белков: эпидермального белка, связывающего жирные кислоты, кальмодулина 1, статмина 1, протимозина α , $\alpha 1$ кислого гликопротеина, кальпонины.

6. Установлена вариабельность белковой композиции в зависимости от характера рефлюктата. При преимущественно кислом рефлюксе отмечена экспрессия кальпонины 1 и цистатина, что, очевидно, направлено на поддержание целостности цитоскелета через десмосомы СО и активацию апоптоза в отношении поврежденных клеток. При щелочном (слабощелочном) рефлюксе установлена экспрессия белка 1, стимулируемого гипоксией,

прохибитина 2, тиоредоксина, что подтверждает наличие гипоксии, индуцированной основными компонентами дуоденального содержимого.

7. Белковый паттерн, идентифицированный при осложненном течении ГЭРБ – ПБ представлен статмином 1, тиоредоксином, белком теплового шока 60-kDa, элонгационным фактором Tc, инорганической пирофосфатазой.

8. Экспрессия молекулы клеточной адгезии - E-кадгерина зависит от характера рефлюктата: компоненты дуоденального содержимого оказывают деструктивное действие на E-кадгерин, что сопровождается значительным снижением ее продукции в СО пищевода, особенно в многослойном плоском и метаплазированном эпителии, и объясняет экспрессию винкулина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Больным с ГЭРБ и ее осложненным течением для объективной оценки состояния СО пищевода и определения прогностических перспектив необходимо использовать расширенный диагностический протокол, включающий исследование протеомного профиля эзофагобиоптатов и иммуногистохимическое определение экспрессии E-кадгерина.

2. Дополнительным критерием диагностики больных с ПБ может служить определение белкового паттерна СО пищевода (Патент РФ № 2655807, 2018. Смирнова Е.А., Тарасова Г.Н. Способ диагностики пищевода Барретта у больных с осложненным течением гастроэзофагеальной рефлюксной болезни// Бюллетень № 16).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Суярова (Смирнова), Е.А. Клиническая гастроэнтерология: учебно-методическое пособие / А.В. Ткачев, Г.Н. Тарасова, Е.А. Суярова (Смирнова)-Ростов-н/Д: Изд-во РостГМУ. – 2015. - 92 с.
2. Суярова (Смирнова), Е.А. Современные методы диагностики осложненных форм гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. Клиническая демонстрация / Е.А. Суярова (Смирнова), С.В. Галкина, А.А. Гулевская, Е.И. Панчева, О.Н. Рыбальченко // Материалы IV Межрегиональной научно-практической конференции студентов, аспирантов, молодых ученых «Интернист». – 2015. – №1. – С.101-104.
3. Суярова (Смирнова), Е.А. Оценка распространенности симптомов гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у студентов с помощью опросника GerdQ / Е.А. Суярова (Смирнова), С.В. Галкина, Л.Р. Пшихачева, А.Р. Рабаданова // Материалы IV Межрегиональной научно-практической конференции студентов, аспирантов, молодых ученых «Интернист». – 2015. – №1. – С.109-110.
4. Суярова (Смирнова), Е.А. **Диагностические возможности протеомного профилирования в гастроэнтерологии / Е.А. Суярова (Смирнова), Г.Н. Тарасова // **Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1 (часть 9) – С. 1921-1925.****
5. Суярова (Смирнова), Е.А. Информативность протеомного профилирования для прогноза течения гастроэнтерологической патологии / Г.Н. Тарасова, Е.А. Суярова (Смирнова), Н.А. Андреянова, И.В. Сарвилина // Материалы XXI Российской гастро недели. РЖГГК. – 2015. – № 5. прил. 46. – С.13.
6. Суярова (Смирнова), Е.А. Анализ новых молекулярных маркеров хронизации гастроэзофагеальной рефлюксной болезни / Е.А. Суярова (Смирнова), Г.Н. Тарасова // Материалы VI Международно-практической конференции

«Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». – 2015. – № 1. – С.181-182.

7. Суярова (Смирнова), Е.А. Биоаналитические методики диагностики и прогнозирования течения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни/ Е.А. Суярова (Смирнова), Г.Н. Тарасова // Материалы IV Съезда терапевтов Южного Федерального округа. – 2015. – № 1. – С.138-139.

8. Суярова (Смирнова), Е.А. Постгеномная медицина: диагностическая ценность протеомного анализа у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью / Е.А. Суярова (Смирнова), Г.Н. Тарасова, А.М. Конорезов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – №10. – С.32-36.

9. Суярова (Смирнова), Е.А. Протеомный спектр слизистой оболочки пищевода при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни/ Е.А. Суярова (Смирнова)// Материалы 3 Итоговой научной сессии РостГМУ. – 2016. – № 1. – С.133-134

10. Суярова (Смирнова), Е.А. Протеомные технологии в изучении осложненного течения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни / Г.Н. Тарасова, Е.А. Суярова (Смирнова) // Материалы XXII Российской гастрономической недели. РЖГГК. – 2016. – № 5, прил. 48. – С.10.

11. Suyarova (Smirnova), E. Modern Methods in esophageal mucosa study in patients with gastroesophageal reflux disease / E.A. Suyarova (Smirnova), G.N. Tarasova // VII Latvian Gastroenterology Congress with International participation. – 2015. – p.74.

12. Суярова (Смирнова), Е.А. Современные технологии в диагностике и прогнозе течения пищевода Барретта/ Е.А. Суярова (Смирнова), Л.И. Клименко // Материалы 4 Итоговой научной сессии РостГМУ. – 2017. – № 1. – С.48-49.

13. Смирнова, Е.А. Патогенетические особенности повреждения слизистой оболочки пищевода при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни / Г.Н. Тарасова, Е.А. Смирнова // Consilium Medicum. - 2017. - № 8.2. - С.7-12.

14. Smirnova, E. Proteome comparative study of the proteins of the mucosa of the esophagus in gastroesophageal reflux disease / E. Smirnova, G. Tarasova // VIII Latvian Gastroenterology Congress with International participation. – 2017. – p. 44.

15. Смирнова, Е.А. Особенности гистоархитектоники слизистой оболочки пищевода у пациентов с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью / А.В. Ткачев, Г.Н. Тарасова, Е.А. Смирнова, Е.А. Синельник // Современные проблемы науки и образования. - 2018. - № 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27461>.

16. Патент РФ № 2655807, 2018. Смирнова Е.А., Тарасова Г.Н. Способ диагностики пищевода Барретта у больных с осложненным течением гастроэзофагеальной рефлюксной болезни // Бюллетень № 16.

Принятые сокращения

АКП -	аденокарцинома пищевода
ГЭРБ -	гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь
ДГР -	дуодено-гастральный рефлюкс
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
КЭ -	катаральный эзофагит
НПС -	нижний пищеводный сфинктер
НЭРБ-	неэрозивная рефлюксная болезнь
ПБ -	пищевод Барретта
ПБК -	пищевод Барретта кислый
ПБЩ -	пищевод Барретта щелочной
РЭ -	рефлюкс-эзофагит
СО -	слизистая оболочка
ЭЭ -	эрозивный эзофагит

Библиотека литературы по функциональной гастроэнтерологии:

www.gastroscan.ru/literature/