

ОСОБЕННОСТИ ГИСТОАРХИТЕКТониКИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПИЩЕВОДА У ПАЦИЕНТОВ С ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Ткачев А.В.¹, Тарасова Г.Н.¹, Смирнова Е.А.¹, Синельник Е.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: okt@rostgmu.ru

Актуальность изучения проблемы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни обусловлена ее высокой распространённостью, рефрактерностью течения на фоне стандартной терапии и высокими рисками осложненного течения с развитием пищевода Барретта. Одним из известных пусковых факторов заболевания является изменение функционального состояния слизистой оболочки пищевода, регулируемого с помощью молекул межклеточной адгезии и межклеточных контактов. Анализ литературы позволяет сделать выводы о том, что изменение соотношения и морфологии белков межклеточных контактов коррелирует с увеличением тяжести гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. На сегодняшний день наиболее изученными из них являются окклюдины 1, 2, 3, 4, E-кадгерин, семейство клаудинов (1, 2), β-катепсин, реже - EPCAM, CD44, v4, v5, v6, но полученные данные остаются противоречивыми и требуют уточнения. В работе проведен анализ взаимосвязи экспрессии молекулы E-кадгерина при различных формах гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и пищеводе Барретта с характеристиками рефлюктата. Установлено, что снижение экспрессии E-кадгерина зарегистрировано в многослойном плоском и метаплазированном эпителии у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и пищеводом Барретта, ассоциированных с преимущественно щелочным рефлюксом, что свидетельствует о нарушении межклеточных взаимодействий в слизистой оболочке пищевода.

Ключевые слова: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, пищевод Барретта, слизистая оболочка, белки межклеточных контактов, E-кадгерин.

FEATURES HISTOARCHITECTONIC OF THE MUCOUS MEMBRANE OF THE ESOPHAGUS IN PATIENTS WITH GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE

Tkachev A.V.¹, Tarasova G.N.¹, Smirnova E.A.¹, Sinelnik E.A.¹

¹Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: okt@rostgmu.ru

The relevance of studying the problems of gastroesophageal reflux disease due to its high prevalence, refractory to current standard therapy and high risk of the complicated course with the development of Barrett's esophagus. One of the known triggering factors of the disease is a change in the functional state of the mucosa of the esophagus, regulated by the molecules of intercellular adhesion molecules and cell-cell contacts. The analysis of literature allows to draw conclusions that change of a ratio and morphology of proteins of intercellular contacts correlates with increase in weight of GERD. Today occludin 1, 2, 3, 4, E-cadherin, family of klaudin (1, 2), β-katepsin are the most studied from them, is more rare - EPCAM, CD44, v4, v5, v6, but the obtained data remain contradictory and demand specification. In this work, the relationship between the expression of the E-cadherin molecule in various forms of GERD and Barrett's esophagus. with the characteristics of refluxate was analyzed. It was found that the decrease of the E-cadherin expression was registered in metaplastic and squamous epithelium in patients with GERD and Barrett's esophagus associated with predominantly alkaline reflux, like an evidence of alterations in cell-cell contacts of esophageal mucosa.

Keywords: gastroesophageal reflux disease, mucous membrane, proteins intercellular contacts, E-cadherin.

Несмотря на несомненные успехи в лечении и контроле ряда кислотозависимых заболеваний, проблема гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) сохраняет актуальность ввиду высокой распространённости, рефрактерности течения на фоне стандартной терапии и высоких рисков осложненного течения с развитием факультативного предракового состояния - пищевода Барретта (ПБ) [1; 2]. Среди известных пусковых факторов заболевания [3] особый интерес представляют изменения функционального

состояния слизистой оболочки (СО) пищевода под воздействием рефлюктата разного характера [4]. Кроме этого, установлено, что проницаемость эпителиального барьера регулируется с помощью молекул межклеточной адгезии и межклеточных контактов [5], которые могут выступать биомаркерами ГЭРБ даже при эндоскопически неизменной СО пищевода [6]. Однако при его нарушении и повреждении субэпителиального пространства развивается каскад реактивных воспалительных, пролиферативных, регенераторных, а часто и дисрегенераторных процессов, что определяет развитие и тяжесть ГЭРБ [5]. При оценке влияния рефлюктата различной кислотности на морфологическую картину СО пищевода, по данным эндоскопического исследования и 24 часовой рН-импедансометрии, была выявлена прямая зависимость между продолжительностью ацидификации пищевода и выраженностью воспалительных изменений [7]. Так, у пациентов с преимущественно кислым характером рефлюктата частота эрозивно-язвенных изменений СО выше, чем у пациентов со смешанным и щелочным рефлюктом, у которых имеются высокие риски метаплазии эпителия [8], что объясняется его воздействием на процессы апоптоза и клеточной дифференцировки [9]. Таким образом, под воздействием агрессивного характера рефлюктата происходит ослабление межклеточных соединений с дальнейшим повреждением эпителия и подлежащих тканей, при этом кислотный «ожог» вызывает гибель клеток и лейкоцитарную инфильтрацию, а некроз, в свою очередь, запускает процессы регенерации, пролиферации базальных клеток и папиллярную гиперплазию базальных кератиноцитов [9].

Анализ литературы позволяет сделать выводы о том, что изменение соотношения и морфологии белков межклеточных контактов коррелирует с увеличением тяжести ГЭРБ [10]. На сегодняшний день наиболее изученными из них являются окклюдины 1, 2, 3, 4, E-кадгерин, семейство клаудинов (1,2), β-катепсин, реже - EpcAM, CD44, v4, v5, v6, но полученные данные остаются противоречивыми и требуют уточнения. Так, Pardon N. et al. (2014), оценивая влияние кислого рефлюктата на функциональную целостность эпителиального барьера и экспрессию белков семейства клаудинов (1, 2, 4), оксида азота-1, филлаггина и оклюдина, не зарегистрировали статистически значимых изменений изучаемых показателей, что, возможно, обусловлено преимущественной локализацией данных белков в зоне кардиоэзофагеального перехода и их «перераспределением» в ответ на воздействие компонентов гастроэзофагеального рефлюктата [11]. К аналогичным выводам ранее пришли Oshima T. et al. (2012) - воздействие кислоты на СО пищевода вызывает «делокализацию» клаудин-4 в поверхностном слое пищевода эпителия [12]. В исследовании Björkman E.V. (2013) была рассмотрена роль щелочного рефлюкса в функциональной состоятельности эпителиального барьера и белков межклеточных контактов эпителия [10]. Установлено, что желчные кислоты и низкие концентрации трипсина увеличивают экспрессию клаудина-1, в

то время как высокие - снижают экспрессию E-кадгерина, клаудина-3 и -4, что позволило авторам сделать выводы, что щелочной рефлюктат повреждает эпителиальный барьер пищевода путем модуляции белков межклеточных контактов [10].

На сегодняшний день среди факторов, приводящих к прогрессированию ГЭРБ, значимым является длительный анамнез заболевания, так как именно продолжительное воздействие рефлюктата приводит к дифференцировке стволовых клеток базальных отделов эпителия в клетки, устойчивого в отношении повреждения, цилиндрического эпителия [13]. Однако о роли молекулярных механизмов межклеточной адгезии в этом процессе известно мало [10]. Так, по данным Swami S. (1995), у пациентов с верифицированным ПБ отмечается снижение мембранной экспрессии молекул межклеточной адгезии, а у пациентов с диспластическими изменениями СО уровень их экспрессии аналогичен таковому при ПБ, однако была зарегистрирована частичная деструкция комплекса E-кадгерин-катенин, ответственного за целостность цитоскелета, что характеризует грубые нарушения гистоархитектоники эпителия в данной группе больных [14].

Известно, что E-кадгерин (cadherin) - одна из центральных молекул клеточной адгезии в эпителиальных тканях, локализованная на мембране и участвующая в образовании адгезионных контактов, являющихся характерной особенностью этих тканей. Установлено, что в тканях взрослого человека E-кадгерин участвует в формировании эпителиального пласта [10]. При этом две молекулы E-кадгерина, прилегающих к друг другу клеток, соединяются посредством внеклеточного домена, функционирующего исключительно в присутствии ионов Ca^{2+} , образуя между ними адгезионные контакты. В немногочисленных экспериментальных исследованиях была показана роль E-кадгерина в обеспечении клеточной пролиферации и дифференцировки [10]. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что функции, связанные с E-кадгерином и β -катенином, играют двойственную роль: с одной стороны, участвуют в формировании межклеточных контактов, а с другой - выступают регуляторами сигнальных путей. По данным ряда авторов [14], изменения экспрессии E-кадгерина при ГЭРБ, особенно при ее осложненном течении, позволяют рассматривать эту молекулу в качестве раннего маркера прогрессирования заболевания. Так, в исследовании Jovov B. et al. (2011) установлено, что проницаемость эпителиального барьера зависит от структурной целостности E-кадгерина, расщепление которого, вероятно, является пусковым фактором в патогенезе ГЭРБ. Авторы предположили, что идентификация расщепленных фрагментов молекулы E-кадгерина может быть ценным биомаркером ГЭРБ [15]. Кроме этого, Roy C. Orlando et al. в 2011 г. зарегистрировали патент «E-кадгерин как биомаркер ГЭРБ», показав прямую связь между изменением концентрации концевых N-фрагментов указанного белка в сыворотке крови и тяжестью ГЭРБ. Таким

образом, представляется целесообразным рассмотреть эти аспекты более подробно.

Цель: изучить экспрессию отдельных компонентов межклеточных соединений при различных формах ГЭРБ и ПБ.

Настоящее исследование выполнено в период с 2016 по 2017 г. на базе консультативно-диагностической поликлиники и гастроэнтерологического отделения клиники ФГБОУ ВО «РостГМУ». На I этапе проводилось комплексное клиническое обследование по стандартному протоколу для пациентов с ГЭРБ [13]. Диагноз верифицирован с использованием клиничко-anamnestических данных, инструментальных методов обследования, включающих: видеоэзофагогастродуоденоскопию с детальным осмотром дистального отдела пищевода в режиме NBI с биопсией и морфологическим исследованием эзофагобиоптатов; 24-часовую внутрипищеводную рН-импедансометрию. Критериями включения пациентов в исследование являлись: амбулаторные и стационарные больные с диагнозом ГЭРБ и ПБ в возрасте от 18 до 55 лет, ограничение приема антисекреторных препаратов в течение 1 мес. Ранжирование больных проводилось в зависимости от результатов 24-часовой внутрипищеводной рН-импедансометрии, демонстрирующих особенности преобладающего характера рефлюктата. Сформированы две исследовательские когорты больных: 1-я группа – 22 пациента (13 женщин и 9 мужчин, средний возраст $44,1 \pm 15,3$ года) с кислым и слабокислым характером рефлюктата, 2-я группа – 12 больных (4 женщины, 8 мужчин, средний возраст $48,7 \pm 12,1$ года) с преимущественно щелочным и слабощелочным рефлюксом. В 1-й группе преобладали пациенты с градацией эрозивного эзофагита (ЭЭ) А и В, во 2-й - больные с ЭЭ градации С, D и ПБ (Лос-Анджелесская классификация рефлюкс-эзофагита, 1994) (табл. 1). Группу сравнения составили 20 здоровых добровольцев.

Таблица 1

Распределение пациентов с ГЭРБ
в зависимости от градации рефлюкс-эзофагита и характера рефлюктата

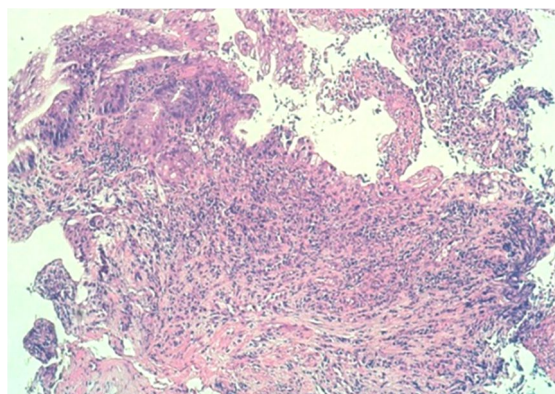
Группы наблюдения	Характер рефлюктата	Градация рефлюкс-эзофагита		
		A, B	C, D	ПБ
1 n=22	преимущественно кислый	10 (45,5%)	7 (31,8%)	5 (22,7%)
2 n=12	преимущественно щелочной, слабощелочной	2 (17%)	4 (33%)	6 (50%)

На II этапе осуществлялось иммуногистохимическое исследование эзофагобиоптатов по стандартной методике с трептавидин-биотиновым методом с использованием

моноклональных мышинных антител к Е-кадгерину (Dako, США). Демаскировку антигена проводили в цитратном буфере с рН 6,0. Ядра клеток докрасивали гематоксилином Майера в течение 15–60 с. Количественный анализ экспрессии Е-кадгерина измерялся условными единицами оптической плотности (УЕОП), где низкий уровень экспрессии соответствовал 21-50 УЕОП, умеренный - 51-100 УЕОП, выраженный - более 100УЕОП. У пациентов с ЭЭ экспрессия Е-кадгерина изучалась в аналогичных зонах в краях и в СО вне эрозивно-язвенных дефектов. У пациентов с верифицированным ПБ экспрессия Е-кадгерина оценивалась в вышеуказанных зонах, а также в участках метаплазии эпителия пищевода по кишечному типу с использованием инвертированного микроскопа Leica DMD 108. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica 10.0 for Windows (StatSoft, USA).

Результаты

Анализ выраженности и активности воспаления СО пищевода не выявил статистически значимых различий между I и II группой пациентов. Так, в I группе у 12 (54,5%) больных регистрировалось умеренное воспаление слабой активности, у 6 (27,3%) – отмечалось резко выраженное активное воспаление (рисунок) и у 4 (18,2%) – неактивное воспаление. У всех обследуемых II группы также отмечено наличие различной степени выраженности и активности воспаления СО пищевода: у 4 (33%) пациентов – активное и резко выраженное, у 2 (17%) – умеренно выраженное слабой активности. Также следует отдельно выделить 6 (50%) пациентов, у которых диагностирован ПБ ($p=0,45$) (табл. 3 А-Г).



Больной С. Рефлюкс кислотного желудочного содержимого. Окраска гематоксилином-эозином. В слизистой оболочке пептическая язва, воспаление выраженной активности

Экспрессия Е-кадгерина в группе здоровых добровольцев регистрировалась на мембране многослойного плоского эпителия, покровного цилиндрического эпителия в зоне кардиоэзофагеального перехода (КЭП), а также в кардиальных железах пищевода и составила: $140,53 \pm 10,6$ УЕОП; $128,97 \pm 9,35$ УЕОП; и $121,55 \pm 6,98$ УЕОП соответственно,

что было принято за диапазон релевантных значений нормальных величин.

При ЭЭ изменение экспрессии Е-кадгерина было зарегистрировано во всех изучаемых образцах вне зон эрозивно-язвенных дефектов: в многослойном плоском эпителии пищевода, покровном цилиндрическом эпителии в зоне КЭП, в кардиальных железах (табл. 2).

Таблица 2

Уровень экспрессии Е-кадгерина у больных с эрозивным эзофагитом
в зависимости от характера рефлюктата

Субстрат исследования	Экспрессия Е-кадгерина (УЕОП)		p<0,05
	Группы наблюдения		
	I	II	
Многослойный плоский эпителий	115,3±35,2	72,76±26,9*	0,019
Покровный цилиндрический эпителий КЭП	89,51±27,64*	44,14±15,90*	0,005
Кардиальные железы	34,18±6,7	28,65	-

* - статистическое различие между показателями у здоровых волонтеров.

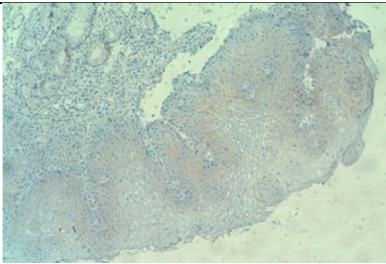
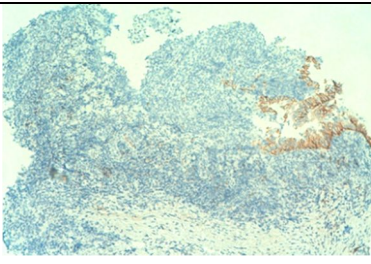
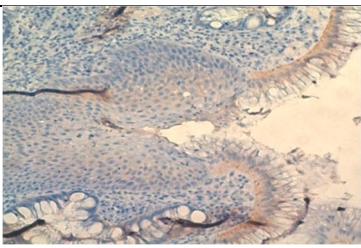
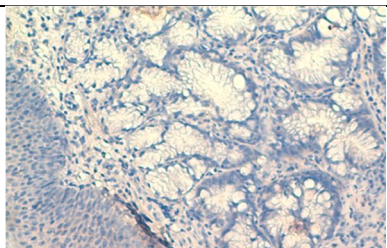
В целом по I исследовательской группе зарегистрировано снижение экспрессии Е-кадгерина в многослойном плоском эпителии, в интервале от 96,4±9,23 УЕОП до 127,4±11,6 УЕОП, составившее в среднем по группе 115,3±35,2 УЕОП (табл. 3А). Во II группе наблюдения, при щелочном характере рефлюктата, регистрировались аналогичные статистически значимые изменения экспрессии Е-кадгерина. Так, в среднем по группе зарегистрировано 2-кратное снижение экспрессии изучаемого белка, составившее 72,76±26,88 УЕОП (p=0,019).

Изменения экспрессии Е-кадгерина в покровном цилиндрическом эпителии КЭП имели аналогичную направленность (табл. 3Б). Так, в I и II исследовательских группах констатировано статистически значимое снижение средних значений экспрессии Е-кадгерина, составившее: 89,51±27,64 УЕОП и 44,14±15,90 УЕОП соответственно, что в 1,5 и 2,9 раза было ниже, чем в группе здоровых волонтеров (p=0,005).

В кардиальных железах пищевода в обеих исследовательских группах зарегистрирована минимальная мембранная экспрессия Е-кадгерина, составившая в среднем по группам 34,18±6,70 УЕОП и 28,65 УЕОП соответственно.

Таблица 3

Иммуногистохимическое исследование с антителами к Е-кадгерину.
Сравнение экспрессии Е-кадгерина в I и II группах

<p>I ГРУППА Рефлюкс кислоты.</p>	 <p>А. Больной М. Сниженная мембранная экспрессия Е-кадгерина. Увеличение x100</p>	 <p>Б. Больной А. Резко выраженная экспрессия Е-кадгерина в покровном цилиндрическом эпителии КЭП в одном из краев язвенного дефекта и отсутствие экспрессии в зоне язвы. Увеличение x100</p>
<p>II ГРУППА Рефлюкс желчи.</p>	 <p>В. Больной Р. Рефлюкс желудочного содержимого, содержащего щелочь. Одиночные фокусы кишечной метаплазии (+). Сниженная мембранная экспрессия Е-кадгерина. Увеличение x200</p>	 <p>Г. Больной К. Рефлюкс желудочного содержимого, содержащего желчь. Отсутствующая мембранная экспрессия Е-кадгерина в зонах кишечной метаплазии и в многослойном плоском эпителии. Увеличение x200</p>

Сравнение экспрессии Е-кадгерина у пациентов с ПБ также проведено в многослойном плоском, покровном цилиндрическом эпителии КЭП, а также в зонах кишечной метаплазии (табл. 4).

Таблица 4

Уровень экспрессии Е-кадгерина у больных с ПБ
в зависимости от характера рефлюктата

Субстрат исследования	Экспрессия Е-кадгерина (УЕОП)		p<0,05
	ПБ		
	I	II	
Многослойный плоский эпителий	69,1±5,5	38,5±5,0*	0,02
Покровный цилиндрический эпителий КЭП	49,2 ±9,2	36,4±12,5*	0,17
Метаплазия по кишечному типу	59,9±14,5	28,6±2,7*	0,008

* - статистическое различие между показателями у больных с эрозивным эзофагитом.

У пациентов I группы в многослойном плоском эпителии регистрировалось 1,5-кратное снижение экспрессии Е-кадгерина, составившее в среднем по группе 69,11±5,52 УЕОП, в то время как во II группе, при щелочном характере рефлюктата, отмечалось 3-

кратное снижение экспрессии изучаемого белка, составившее в среднем по группе $38,52 \pm 5,01$ УЕОП ($p=0,019$). Более значимое снижение экспрессии E-кадгерина было констатировано при иммуногистохимическом исследовании покровного цилиндрического эпителия КЭП и в зонах метаплазии по кишечного типу. Так, в группе больных с преимущественно кислым характером рефлюктата средние значения экспрессии E-кадгерина находились на уровне: $49,2 \pm 9,21$ УЕОП и $59,98 \pm 14,50$ УЕОП соответственно. Максимальное снижение экспрессии изучаемого показателя было зарегистрировано у больных с щелочным характером рефлюктата, составившее в среднем по группе $36,38 \pm 12,5$ УЕОП, что в 2,5 раза было ниже, чем в группе с кислым рефлюксом, и в 3,5 раза ниже, чем у здоровых волонтеров ($p=0,17$). Аналогичное снижение экспрессии E-кадгерина зарегистрировано в зонах кишечной метаплазии. Так, в I группе зарегистрировано более чем 2-кратное снижение экспрессии E-кадгерина, составившее в среднем по группе $59,98 \pm 14,50$ УЕОП (табл. 3В). В группе больных ЭЭ, ассоциированным с щелочным характером рефлюктата, зарегистрирован минимальный уровень мембранной экспрессии E-кадгерина, составивший в среднем по группе $28,59 \pm 2,66$ УЕОП ($p=0,008$) (табл. 3Г).

Выводы

1. Эрозивный эзофагит высоких градаций сопровождается значимым снижением экспрессии E-кадгерина в эпителии пищевода.
2. Резкое снижение экспрессии E-кадгерина зарегистрировано в многослойном плоском и метаплазированном эпителии у больных с ГЭРБ и ПБ, ассоциированных с преимущественно щелочным рефлюксом.

Список литературы

1. El-Serag H.B. Update on the epidemiology of gastroesophageal reflux disease: a systematic review / H.B. El-Serag, S. Sweet, C.C. Winchester, J. Dent // Gut. – 2014. – Vol. 63, № 6. – P. 871-878.
2. Бордин Д.С. Алгоритм ведения больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью // Человек и лекарство. – 2011. – Т. 2. – С. 326–338.
3. Jurgens S. The role of bile acids in the neoplastic progression of Barrett's esophagus - a short representative overview / S. Jurgens, F. Meyer, S.J. Spechler [et al.] // Z. Gastroenterol. – 2012. – Vol. 50, N 9. – P. 1028-1034.
4. Kgomo M. Non-acid gastro-oesophageal reflux is associated with squamous cell carcinoma of the oesophagus / M. Kgomo, T.R. Mokoena, A.J. Ker // BMJ Open Gastroenterol. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 000180.

5. Monkemuller K. Role of tight junction proteins in gastroesophageal reflux disease / K. Monkemuller, T. Wex [et al.] // *Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 12, № 128. – P. 1-12.
6. Kandulski A. Histomorphological differentiation of non- erosive reflux disease and functional heartburn in patients with PPI-refractory heartburn / A. Kandulski, D. Jechorek C. Caro [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 38. – P. 643–651.
7. Кайбышева В.О. Морфофункциональные изменения в пищеводе при ГЭРБ в зависимости от характера рефлюктата / В.О. Кайбышева, А.С. Трухманов, О.А. Сторонова [и др.] // *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии.* – 2014. – № 5. – С. 28-36.
8. Souza R.F. From Reflux Esophagitis to Esophageal Adenocarcinoma // *Dig Dis.* – 2016. – Vol. 34, № 5. – P. 483-490.
9. Amaral J.D. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid / J.D. Amaral, R.J. Viana, R.M. Ramalho [et al.] // *J. Lipid. Res.* - 2009. – Vol. 50, № 9. – P. 1721–1734.
10. Björkman E.V. Esophageal barrier function and tight junction expression in healthy subjects and patients with gastroesophageal reflux disease: functionality of esophageal mucosa exposed to bile salt and trypsin in vitro / E.V. Björkman, A. Edebo, M. Oltean [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 48, N 10. – P. 1118-1126.
11. Pardon N. Effect of the perfusion of acidic and weakly acidic solutions on mucosal integrity and expression of cell-to-cell adhesion proteins in humans / N. Pardon, H. Vanheel, J. Toth // *Neuro gastroenterol. Motil.* – 2014. – Vol. 26. – P. 36-37.
12. Oshima T. Acid modulates the squamous epithelial barrier function by modulating the localization of claudins in the superficial layers / T. Oshima, J. Koseki, X. Chen [et al.] // *Lab. Invest.* – 2012. – Vol. 92. – P. 22–31.
13. Ивашкин В.Т. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь. Клинические рекомендации / В.Т. Ивашкин, И.В. Маев, А.С. Трухманов [и др.] // *Российский журнал гастроэнтерологии и гепатологии, колопроктологии.* – 2017. – Т. 27, № 4. – С. 75-95.
14. Swami S. E-cadherin expression in gastroesophageal reflux disease, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma: an immunohistochemical and immunoblot study / S. Swami, S. Kumble, G. Triadafilopoulos // *Am J. Gastroenterol.* – 1995. – Vol. 90. – 1808–1813.
15. Jovov B. Role of E-cadherin in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease / B. Jovov, J. Que., N.A. Tobey [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 106. – P. 1039–1047.