

5. *Иванова Е.В., Рабинович Ч.М., Тупицын Н.Н.* Иммуноморфологические характеристики красного плоского лишая слизистой оболочки рта // *Стоматология*. – 2003. – Т. 80, № 5. – С. 22–27.
6. *Иванова Н.Н., Мансуров Р.А.* Психосоматическое состояние больных красным плоским лишаем // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2003. – № 5. – С. 28–30.
7. *Кузьмина Э.М.* Профилактика стоматологических заболеваний. Учебное пособие. – М.: Изд-во «Тонга-принт», 2001. – 216 с.
8. *Леус П.А.* Коммунальная стоматология. – Брест, 2000. – 284 с.
9. *Машикллейсон А.Л.* Красный плоский лишай. Заболевания слизистой оболочки полости рта и губ. – М.: Медицина, 1999. – 291 с.
10. *Рахматов Т.П., Исраилов Х.И.* О состоянии слизистой оболочки полости рта и губ // *Вестник дерм. и венерол.* – 2001. – № 3. – С. 31.
11. *Петрова Л.В.* Красный плоский лишай. Заболевания слизистой оболочки полости рта и губ. – М.: Медицина, 1999. – 475 с.
12. *Петрова Л.В.* Особенности клинического течения красного плоского лишая слизистой оболочки рта // *Российский журнал кожных и венерических болезней*. – 2002. – № 3. – С. 28–31.
13. *Рабинович Ч.М.* Современные подходы к лечению красного плоского лишая слизистой полости рта // *Стоматология*. – 2005. – Т. 84, № 5. – С. 28–31.
14. *Спицина В.И.* Местная реактивность слизистой оболочки полости рта у больных красным плоским лишаем // *Рос. стоматологический журнал*. – 2002. – № 4. – С. 18–20.
15. *Стоматологические обследования.* Основные методы. 4-е изд. // ВОЗ, Женева, 1997. – 76 с.
16. *Fellner M.J.* Lichen planus // *Inf. J. Dermatol.* – 1980. – Vol. 19, N 2. – P. 71–75.

УДК 577.121:615.2:[577.175.14:616.33-002.44

УРОВЕНЬ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, ФЕНОТИП ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, АССОЦИИРОВАННОЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ *HELICOBACTER PYLORI*

© Степченко А.А., Филиппенко Н.Г., Прибылова Н.Н., Поветкин С.В.

Кафедра внутренних болезней ФПО, кафедра клинической фармакологии и фармакотерапии
Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: therapy-fpo@mail.ru

В статье представлены результаты исследования цитокинового статуса и фенотипа окислительного метаболизма у больных язвенной болезнью, ассоциированной с различными штаммами *Helicobacter pylori*. У больных язвенной болезнью имеет место провоспалительная цитокинемия (увеличение сывороточной концентрации интерлейкина-8, интерлейкина-1 β , фактора некроза опухоли ФНО α , интерферона- γ) наряду с повышением активности противовоспалительного цитокина – интерлейкина-4. Отмечено, что у больных язвенной болезнью с быстрым фенотипом окислительного метаболизма в сыворотке крови определяется более низкий уровень цитокинов по сравнению с больными с медленным и очень медленным фенотипом окислительного метаболизма. Наиболее выраженные изменения зарегистрированы у больных с очень медленным фенотипом окислительного метаболизма, страдающих язвенной болезнью, ассоциированной с CagA штаммом *Helicobacter pylori*.

Ключевые слова: язвенная болезнь, *Helicobacter pylori*, цитокины, фенотип окислительного метаболизма, цитохром P450.

RATE OF PROINFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES, PHENOTYPE OF OXIDATIVE METABOLISM AMONG PATIENTS WITH PEPTIC ULCER ASSOCIATED WITH DIFFERENT *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS

Stepchenko A.A., Filippenko N.G., Pribylova N.N., Povetkin S.V.

Department of Internal Disease FPE, Department of Clinical Pharmacology & Pharmacotherapy
of the Kursk State Medical University, Kursk

The article presents the investigation of cytokines, phenotype of oxidative metabolism detected according to pharmacokinetics indicants of medication-marker aminophylline among patients with peptic ulcer associated with different *Helicobacter pylori* strains. Proinflammatory cytokinemia (increase of serum concentration of interleukin-8, interleukin-1 β , TNF- α , IFN- γ) together with increment in activity of anti-inflammatory cytokine-interleukin-4 can be observed among patients with peptic ulcer. Among patients with peptic ulcer who have "quick" phenotype of oxidative metabolism in comparison with patients who have "slow" and "very slow" phenotype of oxidative metabolism a lower level of cytokines is detected in blood serum. More evident changes appear among patients with "very slow" phenotype of oxidative metabolism, suffered from peptic ulcer associated with *Helicobacter pylori* CagA.

Keywords: peptic ulcer, *Helicobacter pylori*, cytokines, phenotype of oxidative metabolism, cytochrome P450.

Цитокины являются неотъемлемыми участниками иммунных реакций. Они вовлечены фактически в каждое звено иммунитета и воспаления, включая дифференцировку предшественников клеток иммунной системы, представление антигена, клеточную активацию и пролиферацию, экспрессию молекул адгезии и острофазового ответа [2, 4, 10]. Однако до настоящего времени значение цитокинов в процессах ульцерогенеза, повреждения, защиты и репарации слизистых оболочек желудка и двенадцатиперстной кишки остается недостаточно ясным [4]. С этой точки зрения особый интерес представляет изучение содержания провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкина-1 β , интерлейкина-8, интерферона- γ) в сыворотке крови больных язвенной болезнью (ЯБ). Известно, что интерлейкин-4 (ИЛ-4) принимает участие в ограничении воспалительного ответа путем подавления

секреции провоспалительных цитокинов и регулирует, тем самым, тяжесть повреждения тканей [5]. Однако результаты клинических исследований системной секреции ИЛ-4 при ЯБ носят дискуссионный характер [4, 6], что обуславливает перспективность и актуальность продолжения исследований в этом направлении.

Следует отметить, что цитокины угнетают транскрипцию генов и накопление различных изоформ цитохрома P450 в клетках, возможно и посттранскрипционное угнетение синтеза белка некоторых изоформ. Благодаря цитокиновой модуляции процессов монооксигенирования на цитохроме P450, реализуется адаптация механизмов биотрансформации низкомолекулярных ксено- и эндобиотиков в условиях активации иммунной системы («иммунного» стресса) [7, 9]. В этой связи безусловный интерес представляют исследования по изучению сывороточной концентрации

цитокинов про- и противовоспалительного действия и фенотипа окислительного метаболизма у больных язвенной болезнью, ассоциированной с различными штаммами *Helicobacter pylori* (НР).

Целью исследования явилось изучение сывороточной концентрации про- и противовоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли (ФНО α), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-8 (ИЛ-8), интерферона- γ (ИФН- γ) и ИЛ-4, фенотипа окислительного метаболизма, определенного по показателям фармакокинетики препарата-маркера эуфиллина у больных ЯБ, ассоциированной с различными штаммами НР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 267 больных ЯБ в возрасте от 18 до 48 лет (средний возраст составил $32,4 \pm 15,3$ года), из них – 191 (71,5%) мужчина и 76 (28,5%) женщин. Наблюдаемый контингент подразделяли на больных с локализацией язвенного дефекта в двенадцатиперстной кишке (ЯБДПК) – 213 человек (79,8%) и в желудке (ЯБЖ) – 54 больных (20,2%). Диагноз язвенной болезни устанавливался на основании жалоб, анамнеза, объективных данных, рН-метрии, фиброгастродуоденоскопии с визуальной оценкой слизистой оболочки и прицельной биопсии (не менее 3-4-х биоптатов) из измененных участков слизистой оболочки антрального отдела желудка, луковицы двенадцатиперстной кишки, из эрозий, краев язвы.

Критериями исключения пациентов из исследования явились: язвенный процесс в желудке и двенадцатиперстной кишке, связанный с приемом НПВП и гастринотомии; наличие сосудистого генеза язвообразования (атеросклероз, узелковый периартериит); наличие осложнений язвенной болезни тяжелой степени (рубцовая деформация III ст. с нарушением эвакуаторной функции, пенетрация язвы, малигнизация, рецидивы кровотечения, которые могли потребовать хирургической коррекции; проведенные хирургические операции на ЖКТ, поджелудочной железе, печени и ее воротах, которые могут влиять на секреторную и моторную функцию желудка (хирургическое лечение грыжи пищеводного отверстия диафрагмы, ваготомии, экономные резекции, холецистэктомии и т.д.).

В контрольную группу были включены 110 человек в возрасте от 20 до 45 лет (средний возраст $29,7 \pm 10,5$ года), обследованных в соответствии с протоколом обследования и последующим исключением лиц с выявленными патологическими изменениями в желудке и двенадцатиперстной кишке.

Диагностика НР проводилась с помощью устройства для экспресс-диагностики хеликобактериоза дыхательным методом (*in vivo*) ХЕЛИК®-тест-«АМА» производства фирмы ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», г. Санкт-Петербург. Среди пациентов ЯБ, ассоциированной с НР, проводилась детекция *cagA* штаммов НР методом полимеразной цепной реакции с использованием тест-набора Хеликобактер-токс-ампли-тест на фрагмент гена *cagA* *Helicobacter pylori*, фирмы ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС».

Содержание в сыворотке крови про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИФН- γ , ИЛ-4) определяли методом трехфазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем, производимых специально для научных исследований ООО «Цитокин» (Россия, г. Санкт-Петербург).

Исследование фенотипа окислительного метаболизма проводилось по скорости элиминации препарата-маркера эуфиллина с использованием разработанной в фармакокинетической лаборатории Курского государственного университета методики определения эуфиллина в биожидкостях (слюна), с последующим количественным определением его содержания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (патент России №2008668).

Биохимические и функциональные методы исследования проводились по общепринятым методикам, что позволило оценить функцию различных органов, выявить осложнения и сопутствующие заболевания.

Основные методы статистического анализа фактических данных выбирали согласно задачам исследования. Полученные в работе данные подвергнуты статистической обработке с использованием параметрических и непараметрических методов. Количественные данные в работе представлены в виде $M \pm SD$. Статистический анализ количественных переменных основывался на различии средних арифметических совокупностей. Для сравнения исследуемых показателей с группой контроля использовали дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса. Оценка взаимосвязи между количественными данными проводилась с помощью коэффициента линейной корреляции Пирсона, для оценки взаимосвязи между качественными параметрами использовался критерий χ^2 и коэффициент сопряженности Пирсона (C). Во всех процедурах статистического анализа за уровень значимости принимали $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдаемые пациенты и здоровые люди после оценки персистенции НР различными мето-

дами были рандомизированы на четыре группы: 1 группу (контрольную) составили 28 здоровых лиц с отсутствием НР по данным дыхательного уреазного теста, во 2 группу вошли 16 пациентов ЯБ, у которых НР не обнаружена с помощью дыхательного уреазного теста, 3 группу составили 114 больных ЯБ, у которых выявлена НР с помощью дыхательного уреазного теста и без наличия *CagA* генотипа, 4 группа включала 137 человек, страдающих ЯБ, ассоциированной с *CagA* штаммом НР.

Анализ цитокинового профиля у обследованного контингента установил достоверное повышение уровня ИЛ-8, ИЛ-1 β , ФНО α , ИФН- γ у больных ЯБ по сравнению с группой контроля ($p<0,05$). Сравнительная оценка провоспалительной цитокинемии у больных ЯБ без персистенции НР и у пациентов ЯБ, ассоциированной с НР, показала достоверно более высокий уровень провоспалительных цитокинов у больных ЯБ, ассоциированной с НР (табл. 1). Максимальная концентрация изучаемых цитокинов определена в сыворотке крови больных ЯБ, ассоциированной с *CagA* штаммом НР (табл. 1).

Известно, что НР обладает относительно низкой иммуногенностью и обуславливает длительное взаимодействие микроорганизма с иммунной системой слизистых оболочек и персистенцию инфекции, но способность индуцировать воспалительный ответ у разных штаммов НР различно и во многом определяется их стимулирующим влиянием на выработку эпителиальными клетками различных цитокинов [6]. НР стимулирует продукцию желудочным эпителием и активированными макрофагами провоспалительного цитокина – ИЛ-8. Исследования показали, что уровень ИЛ-8 в сыворотке крови у больных ЯБ без персистенции НР был в 2 раза выше в сравнении с кон-

тролем ($p<0,05$). У больных ЯБ, ассоциированной с *CagA* штаммом НР, содержание ИЛ-8 в сыворотке крови составило $112,2\pm 28,4$ пг/мл, что было в 4,5 и 1,4 раза выше в сравнении с аналогичным показателем у больных ЯБ без персистенции НР и пациентами ЯБ, ассоциированной с банальным штаммом НР ($p<0,05$). Данная ситуация объясняется тем, что ИЛ-8 является не только хемоаттрактантом для нейтрофилов, но и может активировать клетки в очаге воспаления, усиливая адгезию и дегрануляцию нейтрофилов, активируя выброс супероксидных радикалов и фагоцитоз [5].

При определении сывороточной концентрации ИЛ-1 β , ФНО α выявлены следующие изменения: содержание ИЛ-1 β и ФНО α в группе пациентов с *CagA* штаммом НР было в 1,3 выше, чем при обнаружении банального штамма НР ($p<0,05$), ИЛ-1 β в 2,2 раза, ФНО α в 2,7 раза выше, чем в группе больных ЯБ, не ассоциированной с НР ($p<0,05$).

ФНО α является сильнейшим стимулом для продукции ИЛ-1 β , являющегося главным медиатором развития местной воспалительной реакции в сосудистой стенке и острофазового ответа на уровне организма. ИЛ-1 β синтезируется макрофагами и моноцитами, а также клетками сосудистого эндотелия. ИЛ-1 β проявляет широкий спектр локальных и системных эффектов, к которым относятся: активация Т- и В- лимфоцитов, индукция синтеза молекул адгезии и ИЛ-8 [8, 10]. Поэтому повышение уровня ИЛ-1 β и ФНО α является неотъемлемым механизмом прогрессирования иммунных нарушений при ЯБ.

Максимальная концентрация ИФН- γ в сыворотке крови больных ЯБ имела место при ассоциации ЯБ с *CagA* штаммом НР. Очевидно, что ИФН- γ является медиатором клеточного иммунитета. Этот цитокин синтезируется Т-лимфо-

Таблица 1

Концентрация про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ЯБ в зависимости от штамма НР

Показатель, пг/мл	Группа контроля n=28	Больные ЯБ НР – n=16	Больные ЯБ НР + n=114	Больные ЯБ НР <i>CagA</i> + n=137
	Дыхательный уреазный тест			ПЦР
	1	2	3	4
ИЛ-8, пг/мл	$12,2\pm 3,8$	$44,8\pm 4,2$	$102,2\pm 20,2^{*1,2}$	$212,2\pm 28,4^{*1-3}$
ИЛ-1 β , пг/мл	$33,4\pm 4,1$	$70,6\pm 8,3^{*1}$	$98,4\pm 15,6^{*1,2}$	$222,4\pm 32,4^{*1-3}$
ФНО α , пг/мл	$15,7\pm 2,7$	$130,2\pm 18,8^{*1}$	$164,4\pm 27,8^{*1,2}$	$382,3\pm 45,6^{*1-3}$
ИФН- γ , пг/мл	$9,8\pm 1,2$	$16,4\pm 2,5^{*1}$	$27,6\pm 4,6^{*1,2}$	$110,6\pm 22,5^{*1-3}$
ИЛ-4, пг/мл	$22,4\pm 4,3$	$64,8\pm 8,6^{*1}$	$273,6\pm 31,4^{*1,2}$	$368,4\pm 41,2^{*1-3}$

Примечание: * – $p<0,05$ – достоверность различий между группами.

цитами 1-го типа и играет главную роль в качестве макрофаг-активирующего фактора, стимулятора функциональной активности Т-лимфоцитов киллеров и NK-клеток [3].

Цитокины составляют сеть взаимодействия в организме с большим количеством прямых и обратных связей. Цитокиновая сеть является саморегулирующейся системой, нарушение в которой приводит к избыточному или недостаточному синтезу определенных цитокинов, что в свою очередь может приводить к развитию разнообразных патологических процессов, составляющих основу широкого спектра заболеваний человека [8, 10]. С учетом роли ИЛ-4 в контроле воспаления проведено изучение его уровня у больных ЯБ, ассоциированной с различными штаммами НР. Сравнение содержания ИЛ-4 у больных ЯБ без НР и в группе контроля показало достоверно более высокий уровень ИЛ-4 в группе больных ЯБ ($34,8 \pm 3,6$ пг/мл и $22,4 \pm 4,3$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Максимальная концентрация ИЛ-4 в сыворотке крови больных ЯБ определена в группе больных ЯБ, ассоциированной с CagA штаммом НР ($68,4 \pm 5,2$ пг/мл, $p < 0,05$).

Каскадный характер действия цитокинов объясняется тем, что один цитокин влияет на продукцию другого. ИЛ-4 обладает способностью ингибировать продукцию цитокинов мононуклеарного происхождения ИЛ-1 β и ФНО α и цитотоксичность макрофагов [4]. Определение взаимосвязи между уровнем ИЛ-4 и провоспалительными цитокинами установило прямую корреляционную зависимость между ИЛ-4 и ИЛ-1 β ($r = 0,68$, $p < 0,01$), ИЛ-4 и ФНО α ($r = 0,54$, $p < 0,05$), ИЛ-4 и ИЛ-8 в сыворотке крови больных ЯБ ($r = 0,68$, $p < 0,05$).

Таким образом, наряду с установленной провоспалительной цитокинемией у больных ЯБ имеет место повышение активности противовоспалительного цитокина ИЛ-4. Вероятно, повышение уровня ИЛ-4 в данной ситуации носит компенсаторный характер по отношению к провоспа-

лительным цитокинам и выступает в качестве фактора, стабилизирующего течение заболевания.

Известно, что оценка функционального состояния микросомальных гидролаз у людей необходима для индивидуальных схем назначения препаратов [1, 12]. Существует ряд прямых и косвенных методов определения активности этих ферментов. Первые предполагают исследование биопсийных материалов печени, а вторые - оценку параметров фармакокинетики модельных препаратов. С конца 60-х годов применяется метод определения скорости метаболизма лекарств с помощью препаратов - «маркеров» [7, 11]. Принцип его заключается в том, что при условии одинаковых механизмов окисления различных препаратов (катализ осуществляется одним и тем же ферментом, активность которого генетически детерминирована и остается у данного человека постоянной) можно по скорости окисления малотоксичного лекарственного средства (метаболического маркера) судить об активности окислительных процессов у конкретного человека в отношении многих окисляющихся препаратов [7].

Поэтому безусловный интерес представляло изучение фенотипа окислительного метаболизма у больных ЯБ. В ходе исследования установлено (табл. 2), что среди 267 человек, страдающих язвенной болезнью, быстрый фенотип окисления определен у 106 больных (39,7%), медленный фенотип окислительного метаболизма зарегистрирован у 119 пациентов (44,6%), у 42 больных обнаружен очень медленный фенотип окисления (15,7%).

Изучение уровня про- и противовоспалительных цитокинов у обследуемого контингента в зависимости от фенотипа окислительного метаболизма (рис. 1) показало более низкую их концентрацию в сыворотке крови больных ЯБ с быстрым фенотипом окислительного метаболизма по сравнению с больными, имеющими медленный ($p < 0,01$) и очень медленный фенотипы окислительного метаболизма ($p < 0,01$).

Таблица 2

Распределение больных язвенной болезнью по скорости окислительного метаболизма в зависимости от наличия НР

Группа больных	n	Фенотип окислительного метаболизма		
		быстрый $T_{1/2} < 9$	медленный $T_{1/2} = 9-15$	очень медленный $T_{1/2} > 15$
ЯБДПК	213	85	95	33
НР+	202	81	90	31
НР-	11	4	5	2
ЯБЖ	54	21	24	9
НР+	49	19	22	8
НР-	5	2	2	1
Итого	267	106/39,7%	119/44,6%	42/15,7%

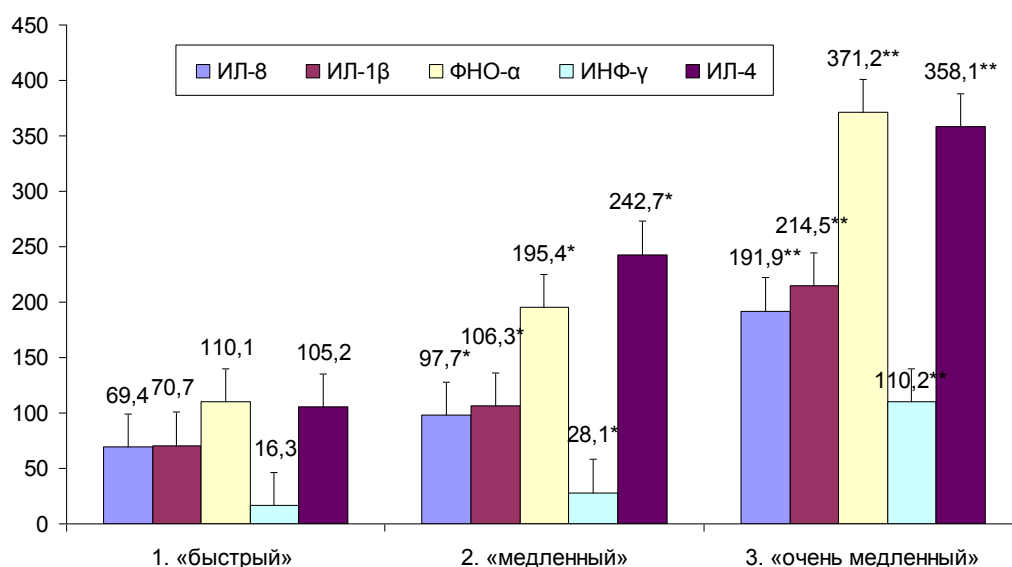


Рис. 1. Уровень про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ЯБДПК в зависимости от фенотипа окислительного метаболизма.

Примечание: * – $p < 0,05$ достоверность различий между группами с медленным и быстрым фенотипом окислительного метаболизма, ** – $p < 0,05$ достоверность различий между «очень медленными» и «быстрыми» и «медленными» окислителями.

Таблица 3

Частота различных фенотипов окислительного метаболизма у больных язвенной болезнью в зависимости от наличия различных штаммов НР

№ п/п	Фенотип окислительного метаболизма	n	Больные ЯБ		
			НР – n=16	НР + n=114	НР CagA+ n=137
1.	Быстрый	106	6	61	39
2.	Медленный	119	7	38	74
3.	Очень медленный	42	3	15	24

Таким образом, в результате исследования выявлена гиперпродукция ИЛ-8, ИЛ-1β, ФНОα, ИНФ-γ, ИЛ-4 у больных ЯБ. Выраженность указанных изменений зависела от фенотипа окислительного метаболизма.

В нашей работе проведен анализ сопряженности фенотипа окислительного метаболизма с выявлением НР (табл. 3). Выявлены следующие закономерности: CagA генотип НР обнаруживается достоверно чаще у больных с медленным и очень медленным метаболизмом ($\chi^2 = 16,6$, $C=0,2$, $p=0,002$).

Следует отметить, что при рассмотрении проблем, касающихся «неиммунных» функций иммунной системы, от внимания исследователей нередко «ускользает» один очень важный аспект. Это взаимосвязь иммунной системы с системой биотрансформации низкомолекулярных соединений – системой цитохром Р450-зависимых монооксигеназ, которая включает цитохром Р450 и сопряженную с ним электронотранспортную цепочку [9]. В то же время содержание цитохрома Р450 и монооксигеназные активности в печени и

других тканях снижаются при развитии бактериальных и вирусных инфекций, иммунизации различными антигенами в условиях фармакологической иммуностимуляции [9].

В нашей работе выявлено, что, по всей видимости, *Helicobacter pylori* (особенно CagA генотип) приводит к увеличению пула про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных язвенной болезнью, а это, в свою очередь, может подавлять активность изоферментов цитохрома Р450 и привести к изменению фенотипа окислительного метаболизма и увеличению токсического эффекта препаратов, применяемых для лечения ЯБ в обычной дозировке, что позволяет оптимизировать поиск лечебного воздействия у больных ЯБ, решить проблемы индивидуализации антисекреторной терапии.

Таким образом, у больных ЯБ имеет место провоспалительная цитокинемия наряду с повышенной активностью противовоспалительного цитокина ИЛ-4. Данные изменения у больных ЯБ наиболее выражены при наличии токсигенного штамма НР. Наибольший уровень ИЛ-8, ИЛ-1β,