УДК 616.342:615.272

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ НА ФОНЕ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ СУЛЬФАТ ЦИНКА

Карзакова Л.М.[1], Захарова В.В.[2], Кудряшов С.И.[1], Комелягина Н.А.[1], Луткова Т.С.[1], Пыркина О.В.[1], Верендеева М.А.[1]

[1]ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, Чебоксары, e-mail: luizak58@mail.ru;
[2]БУ «Центральная городская больница» Минздрава Чувашии, Чебоксары, e-mail: tinaz@bk.ru

Целью работы явилось изучение динамики содержания цитокинов в десневой жидкости у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) под влиянием стандартной антихеликобактерной терапии и комплексного лечения, включающего помимо стандартной терапии цинксодержащий препарат – сульфат цинка. Для реализации поставленной цели в исследование включено 2 группы больных с впервые диагностированной ЯБДПК. В лечении пациентов одной из групп использовали стандартную трехкомпонентную эрадикационную терапию, другой – стандартный комплекс препаратов в сочетании с сульфатом цинка. Количественное определение цитокинов (IL-1β, RAIL-1β, IL-2, IL-4, IL-10, TNFα, IFN-γ) в десневой жидкости проводили методом твердофазного иммуноферментного метода с использованием тест-наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Полученные уровни цитокинов сравнивали с таковыми у группы практически здоровых лиц с интактными тканями пародонта, В момент поступления в стационар у больных ЯБДПК обнаружено повышение уровней про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-4, TNFα, IFN-γ, RAIL-1β). Анализ показателей цитокинового статуса десневой жидкости спустя 1 месяц после проведенной терапии выявил существенное снижение всех исходно повышенных уровней цитокинов в обеих группах больных. При этом у больных, в лечении которых использовали стандартные антихеликобактерные средства, уровни IL-2 и IFN-γ стали ниже соответствующих показателей у здоровых. У больных, в терапию которых был добавлен сульфат цинка, сохранялся больший уровень провоспалительного цитокина – IL-1β, чем в сравниваемой группе пациентов, а уровни IL-2 и IFN-γ были на уровнях, характерных для здоровых лиц.

Ключевые слова: язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, цитокины, десневая жидкость, Helicobacter pylori, сульфат цинка.

DYNAMICS OF CYTOKINE LEVELS IN GINGIVAL FLUID IN PATIENTS WITH DUODENAL ULCER UNDER THE INFLUENCE OF THE COMPLEX THERAPY INCLUDING ZINC SULPHATE

Karzakova L.M.[1], Zakharova V.V.[2], Kudryashov S.I.[1], Komelyagina N.A.[1], Lutkova T.S.[1], Pyrkina O.V.[1], Verendeeva M.A.[1]

[1]The I.N.Ulianov Chuvash state university, Cheboksary, e-mail: luizak58@mail.ru;
[2]Central City Hospital of Health Care Ministry of Chuvashia, Cheboksary, e-mail: tinaz@bk.ru

The aim of the work was to study the dynamics of cytokine content in the gingival fluid in patients with duodenal ulcer (DU) under the influence of standard anti-helicobacter therapy and complex treatment, which includes a zinc-containing drug - zinc sulfate, in addition to the standard therapy. To achieve this goal, 2 groups of patients with newly diagnosed DU were included in the study. In the treatment of patients in the first group, a standard standard three-component eradication therapy was used, the other - a standard complex of drugs in combination with zinc sulfate. The quantitative determination of cytokines (IL-1β, RAIL-1β, IL-2 IL-4, IL-10, TNFα, IFN-γ) in the gingival fluid was performed by the method of enzyme-linked immunosorbent method using Cytokine test kits (C- Petersburg). The obtained levels of cytokines were compared with those of the group of practically healthy individuals with intact periodontal tissues. An increase in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-2, IL-4, TNFα, IFN-γ, RAIL-1β) was detected at the time of admission to the hospital of DU patients. Analysis of the cytokine status of the gingival fluid after 1 month after therapy revealed a significant decrease in all initially elevated levels of cytokines in both groups of patients. At the same time, in patients in whose treatment standard anti-helicobacter agents were used, the levels of IL-2 and IFN-γ were lower than the corresponding indicators in healthy people. Patients whose treatment was supplemented with zinc sulphate maintained a higher level of pro-inflammatory cytokine, IL-1β, than in the compared group of patients, and the levels of IL-2 and IFN-γ were at levels characteristic of healthy individuals.

Keywords: duodenal ulcer, cytokines, gingival fluid, Helicobacter pylori, zinc sulphate.

Основным этиологическим фактором язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) является грамотрицательная спиралевидная бактерия Helicobacter pylori (H. pylori) [1]. H. pylori выявляется у 80-95% пациентов с ЯБДПК [2]. Несмотря на то что более 50% населения мира инфицированы H. pylori [3], лишь 10-20% инфицированных заболевают язвенной болезнью [4]. В настоящее время ЯБДПК нередко протекает бессимптомно, обнаруживая себя на стадии развития осложнений (перфорация, желудочно-кишечное кровотечение, рубцовый стеноз привратника или постбульбарного отдела двенадцатиперстной кишки и др.). Малосимптомность современного течения ЯБДПК, видимо, связана с недостаточной активацией иммунного ответа на хеликобактерную инфекцию в связи с общей иммунокомпрометированностью человека в современных условиях его жизни. Первыми реагируют на инфекционные патогены клетки врожденного иммунного ответа, и клинические проявления любого инфекционно-воспалительного процесса, к разряду которых можно отнести ЯБДПК, зависят от степени активации клеток врожденного иммунного ответа и уровней выработки провоспалительных цитокинов. Патологические процессы, происходящие в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), отражаются на функциональном состоянии полости рта, являющейся составной частью ЖКТ. Известно, что H. pylori часто обнаруживается в полости рта (зубной бляшке, слюне, миндалинах, аденоидах) [5]. Хеликобактерная инфекция способна индуцировать продукцию цитокинов клетками иммунной системы и эпителиальными клетками, ингибировать иммунный ответ, вызывать мутационные процессы [6]. Десневая жидкость представляет собой биосубстрат, вполне пригодный для идентификации и измерения таких биомаркеров, как цитокины, поскольку ее можно легко и неинвазивно отобрать для исследования [7]. Однако в доступной литературе мы не обнаружили данных по изучению уровней цитокинов в десневой жидкости у больных ЯБДПК.

Цель настоящего исследования – изучение содержания цитокинов в десневой жидкости у больных ЯБДПК в дебюте заболевания и в динамике лечения с использованием разных методов терапии – общепринятой тройной схемы лечения (антихеликобактерные антибиотики, ингибиторы протонной помпы париетальных клеток желудка) [8] и комплексной терапии, включающей помимо стандартных лекарственных средств сульфат цинка, обладающий иммунотропным эффектом [9].

Материалы и методы исследования. В исследование введено 3 группы обследуемых. Первая группа состояла из здоровых лиц (n=20) с интактными тканями пародонта. Вторая и третья группа включали больных с впервые диагностированной ЯБДПК

по 30 человек в каждой группе. Наличие хеликобактерной инфекции устанавливали с помощью уреазного теста, проводимого в ходе осуществления эзофагогастродуоденоскопии, а также по результатам тестирования специфических антител IgM и IgG в сыворотке крови к наиболее специфическому и вирулентному антигену Helicobacter pylori (H. pylori) – CagA [10]. Наряду с этим проводили исследование копрофильтрата на обнаружение ДНК H. pylori методом полимеразной цепной реакции. У включенных в исследование лиц проводили изучение показателей индексной оценки состояния пародонта с использованием таких показателей, как индекс гигиены полости рта, степень кровоточивости десен по индексу кровоточивости PBI, папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (PMA) [11].

В лечении первой группы пациентов использовали стандартные антихеликобактерные препараты первой линии (амоксициллин 2 г/сут., кларитромицин 1 г/сут., омепразол 40 мг/сут.). В комплекс лечебных средств, использованных при лечении пациентов второй группы, был добавлен сульфат цинка в составе лекарственного препарата – цинктерал, содержащего в одной таблетке 45 мг элементарного цинка. Помимо общепринятых стандартных лабораторно-инструментальных методов исследования проводили определение содержания цитокинов в десневой жидкости. Забор последней осуществляли по методу Жулева Е.Н., Серова А.Б. [12]. Количественное определение цитокинов – IL-1β (интерлейкин-1β), RAIL-1β (рецепторный антагонист интерлейкина-1β), IL-2 (интерлейкин-2), IL-4 (интерлейкин-4), IL-10 (интерлейкин-10), TNFα (фактор некроза опухоли α), IFN-γ (интерферон-γ) - проводили методом твердофазного иммуноферментного метода с использованием тест-наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Указанные исследования проводили перед началом эрадикационной терапии и через 1 месяц после завершения лечения. Статистическую обработку проводили с помощью электронной программы (Statistica-v.10), при этом определяли показатели описательной статистики – среднюю арифметическую (M) и стандартное отклонение (SD).

Результаты исследования и их обсуждение. В таблице 1 представлена общая характеристика обследованных групп**.** При поступлении в стационар у больных обнаруживали болевой, диспепсический и астенический синдромы, связанные с ЯБДПК. 12 пациентов не имели болевых ощущений. В группе больных ЯБДПК чаще выявлялись лица с признаками пародонтита (боль в зубах и челюсти при надкусывании пищи и жевании, застревание пищи в межзубных щелях, пародонтальных карманах, кровоточивость десен, гноетечение из межзубных щелей, десневых и пародонтальных карманов, неприятный запах изо рта) по сравнению с группой здоровых лиц. При объективном исследовании обнаруживались признаки катарального или язвенного гингивита, повышение подвижности зубов, пародонтальные карманы с серозно-гнойным содержимым.

Таблица 1

Общая характеристика групп исследования

Показатель	Здоровые, n=20	Больные ЯБДПК	
		Стандартная терапия, n=30	Стандартная терапия + сульфат цинка, n=30
Женщины/мужчины	15/5	22/8	24/6
Возраст, годы	39,5±10,9	38,4±11,3	39,8±11,9
Болевой синдром, чел.	0	23	25
Диспепсия, чел.	0	21	24
Астения, чел.	0	21	27
Степень кровоточивости десны	0	2,66±0,45	2,71±0,51
РМА, %	0	59,1±6,2	57,3±5,5
Индекс гигиены, баллы	1,1±0,3	2,5±0,50	2,7±0,45

В результате изучения содержания цитокинов в десневой жидкости выявлено существенное повышение уровней большинства цитокинов у больных ЯБДПК (таблица 2). Исключение составил противовоспалительный цитокин – IL-10, уровень которого практически не отличался от такового у здоровых лиц.

Таблица 2

Уровни цитокинов в десневой жидкости у больных ЯБДПК и здоровых

Цитокин, пг/мл	Больные ЯБДПК, n=60	Здоровые, n=20	p<
	M±SD	M±SD	
IL-1β	1430,6±811,8	81,4±73,7	<0,001
RAIL-1β	33570,7±2301,5	20339,1±1821,6	<0,001
IL-2	1601,3±195,9	1155,3±106,4	<0,001
IL-4	55,0±6,6	45,1±3,3	<0,001
IL-10	153,4±68,2	106,7±102,3	>0,05
TNFα	30,8±2,2	25,5±3,3	<0,001
IFN-γ	316,8±225,5	34,1±15,4	<0,001

Анализ уровней цитокинов в десневой жидкости через 1 месяц после проведенного в стационарных условиях лечения показал, что в обеих группах больных независимо от

использованного метода лечения произошло снижение исходно повышенных уровней провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNFα и IFN-γ, а также противовоспалительных цитокинов – RAIL-1β, IL-4 (таблица 3).

Таблица 3

Динамика уровней цитокинов в десневой жидкости у больных ЯБДПК под влиянием различных методов лечения

Цитокины, пг/мл		Больные ЯБДПК		p
		Стандартная терапия, (n=30)	Стандартная терапия + сульфат цинка, (n=30)	
		M±SD	M±SD	
IL-1β	I	1390,3±786,7	1461,1±778,7	>0,05
	II	216,9±117,9 ^ ***	84,8±11,4^	<0,001
RAIL-1β	I	31936±2219	34847±2551	>0,05
	II	21671±1401^ **	20286±904^	<0,001
IL-2	I	1174,7±161,8	1147,5±161,5	>0,05
	II	781,1±158,8***	1223,3±205,1	<0,001
IL-4	I	55,0±8,0	55,0±6,0	>0,05
	II	46,4±6,5^	45,4±5,3^	>0,05
IL-10	I	109,0±6,4	98,6±5,5	>0,05
	II	101,1±14,9	96,1±3,7	>0,05
TNFα	I	32,8±0,1	32,8±0,2	>0,05
	II	24,2±2,1^	26,1±3,5^	>0,05
IFN-γ	I	324,7±11,0	324,6±16,1	>0,05
	II	23,7±14,7^ *	37,3±17,0^	<0,01

Примечания: I – значение показателя до лечения, II – значение показателя через 1 месяц после лечения; p – степень достоверности различий значений показателей сравниваемых групп больных; знаком (^) обозначено достоверное изменение значения показателя относительно исходного значения; звездочкой (*) отмечена степень достоверности показателя относительно значения группы здоровых лиц (* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001).

Степень изменения содержания цитокинов различалась в зависимости от примененного комплекса терапии. Так, при добавлении в схему комплексного лечения ЯБДПК сульфата цинка уровень IL-1β снижался в 17,2 раза относительно исходного уровня, уровень RAIL-1β – в 1,7 раза, при применении стандартной терапии уровни данных цитокинов снижались в 6,4 и 1,4 раза соответственно. В результате у больных, получавших соединение цинка, уровни IL-1β и RAIL-1β спустя 1 месяц после лечения сравнялись с показателями здоровых лиц. Уровни IL-2 и IFN-γ, обладающих регулирующим действием в

отношении клеточного механизма адаптивного иммунного ответа, после лечения стандартным комплексом антихеликобактерных средств оказывались ниже референсных значений. В то же время в группе больных, получавших сульфат цинка, данные цитокины практически совпадали с уровнями здоровых лиц.

Выявлены существенные различия в результатах контрольных клинико-инструментальных исследований, по которым оценивалась эффективность лечения больных ЯБДПК спустя 1 месяц после проведенной терапии. Так, у 86,6% пациентов, в лечении которых использовали стандартную схему, произошло рубцевание язвенного дефекта, в то время как включение в эту же схему цинксодержащего препарата повышало процент больных с зарубцевавшейся язвой до 95%. При этом у первых зафиксировано значительное снижение уровней антихеликобактерных антител: IgM с исходного уровня 89±82 до 15,0±5,8 Ед/мл ($p<0,001$), IgG с 270±166 до 17, 5±14,4 Ед/мл ($p<0,001$). Во второй группе больных отмечено также снижение уровня специфических IgM с 103±49 до 12±14 Ед/мл ($p<0,001$), но количество антихеликобактерных антител IgG оставалось практически на исходном уровне (исходный уровень – 209±191 Ед/мл, конечный – 186±348 Ед/мл). При этом в группе пациентов, получавших сульфат цинка, был выше процент эрадикации H. pylori: ДНК бактерий H. pylori в копрофильтрате обнаруживалась лишь у 16,6% больных, в то время как в сравниваемой группе пациентов – у 43,3% ($p<0,05$).

Заслуживает внимания тот факт, что антихеликобактерная терапия сказывалась положительно на состоянии тканей пародонта. Так, в группе, получавшей стандартную терапию, степень кровоточивости снижалась с 2,66±0,45 до 1,9±0,28, РМА с 59,1±6,2 до 22,3±4,1%, индекс гигиены с 2,5±0,5 до 1,32±0,3 балла. Добавление в схему лечения сульфата цинка усиливало положительную динамику показателей индексной оценки состояния пародонта у больных ЯБДПК: степень кровоточивости десны уменьшилась с 2,71±0,51 до 1,41±0,2 ($p<0,01$ – относительно показателя сравниваемой группы больных) и РМА – с 57,3±5,5 до 15,5±3,5% ($p<0,01$).

Итак, к концу исхода 1 месяца после лечения уровни провоспалительного цитокина TNFα и противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 у больных ЯБДПК обеих групп сравнивались со значениями здоровых. Уровень основного провоспалительного цитокина IL-1β на фоне терапии сульфатом цинка снижался до значения здоровых лиц. Под влиянием стандартной терапии снижение уровня данного цитокина было менее выраженным. Уровни IL-2 и IFN-γ снижались в обеих группах: в группе больных, принимавших сульфат цинка, до уровней здоровых лиц, в то время как у пациентов, получавших стандартную терапию, становились ниже значений здоровых.

Положительное влияние сульфата цинка на результат противоульцерогенного лечения

мы объясняем тем, что микроэлемент цинк является ключевым фактором в обеспечении иммунореактивности организма человека. Он участвует в регуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа. Цинк способен модулировать провоспалительный ответ через влияние на транскрипционный фактор – NF-κβ, являющийся регулятором провоспалительных реакций. Дефицит цинка вызывает атрофию тимуса, Т-лимфоцитопению и расстройство Т-клеточно-опосредованного иммунного ответа, следовательно, противоинфекционной защиты. В условиях дефицита цинка нарушается способность полиморфноядерных лейкоцитов к хемотаксису и фагоцитированию. Устранение дефицита цинка восстанавливает нарушенные функции полиморфноядерных лейкоцитов, Т-лимфоцитов [13]. Результаты ранее проведенного нами исследования демонстрировали улучшение иммунологических показателей на системном уровне у больных ЯБДПК при добавлении в комплекс терапевтических средств соли цинка, что проявлялось в повышении показателей клеточного звена адаптивного иммунитета и фагоцитарной активности нейтрофилов, снижении сывороточных уровней IgM, циркулирующих иммунных комплексов, TNFα и IL-10 [14]. Особого внимания заслуживают данные литературы, свидетельствующие о том, что цинк способен подавлять продукцию провоспалительных цитокинов путем снижения экспрессии генов IL-1 и TNF-α через ингибирование NF-κβ-опосредованного сигнального пути активации продукции данных цитокинов [15].

Заключение. Результаты проведенного лечения свидетельствуют о том, что стандартная трехкомпонентная терапия у больных ЯБДПК не обеспечивает восстановления измененных в дебюте заболевания показателей цитокинового профиля до уровней здоровых: через 1 месяц после лечения остается повышенным уровень провоспалительного цитокина IL-1β на фоне сниженных относительно показателей здоровых и сравниваемой группы уровней IL-2 и IFN-γ – основных цитокинов адаптивного иммунного ответа. У больных, получавших дополнительно к стандартному комплексу лекарственных средств сульфат цинка, восстановились до нормальных значений уровни IL-1β, IL-2 и IFN-γ. При этом сохранялась активация продукции специфических антихеликобактерных IgG-антител. Эти данные позволяют думать о стимулирующем влиянии соединения цинка на протективный иммунный ответ против H. pylori. Об этом же свидетельствует хороший результат эрадикации данного инфекционного патогена, составляющий 83,4% при использовании сульфата цинка. Параллельное действие терапии, включающей сульфат цинка, на состояние тканей пародонта, заключающееся в уменьшении кровоточивости и воспаления десен, улучшении гигиены полости рта, требует дальнейшего осмысления полученных данных и продолжения исследований.

Список литературы

1. Alakkari A., Zullo A., O'Connor H.J. Helicobacter pylori and nonmalignant diseases. Helicobacter. 2011. vol. 16. suppl 1. P. 33-37. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00878.x.
2. Hentschel E., Brandstätter G., Dragosics B., Hirschl A.M., Nemec H., Schütze K., Taufer M., Wurzer H. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of Helicobacter pylori and the recurrence of duodenal ulcer. N. Engl. J. Med. 1993. vol. 328. no. 5. P. 308-312. DOI: 10.1056/NEJM199302043280503.
3. Eusebi L.H., Zagari R.M., Bazzoli F. Epidemiology of helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2014. vol. 19. suppl. 1. P. 1-5. DOI: 10.1111/hel.12165.
4. Dorer M.S., Talarico S., Salama N.R. Helicobacter pylori's unconventional role in health and disease. PLoS Pathog. 2009. vol. 5. no. 10. e1000544. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000544.
5. Nisha K.J., Nandakumar K., Shenoy K.T., Janam P. Periodontal disease and *Helicobacter pylori* infection: a community-based study using serology and rapid urease test. J. Investing Clin. Dent. 2016. vol. 7. P. 37-45. DOI: 10.1111/jicd.12122.
6. Vinagre R.M.D.F., Vinagre I.D.F., Vilar-E-Silva A., Fecury A.A., Martins L.C. Helicobacter pylori infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases. Arq. Gastroenterol. 2018. vol. 55. no. 2. P. 122-127. DOI: 10.1590/S0004-2803.201800000-21.
7. Bostanci N., Belibasakis G.N. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. Periodontol. 2018. vol. 76. no 1. P. 68-84. DOI: 10.1111/prd.12154
8. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Atherton J., Axon A.T., Bazzoli F., Gensini G.F., Gisbert J.P., Graham D.Y., Rokkas T., El-Omar E.M., Kuipers E.J. Management of Helicobacter pylori infection – the Maastricht IV Florence Consensus report. Gut. 2012. vol. 61. P. 646-664. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302084.
9. Карзакова Л.М. Иммуногенетические исследования популяции здоровых людей и больных инфекционно-воспалительными заболеваниями легких, проживающих в регионе естественного дефицита цинка: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2005. 40 с.
10. Kalali B., Formichella L., Gerhard M. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Changes towards the Future. Diseases. 2015. Vol. 3. no. 3. P. 122-135. DOI:10.3390/diseases3030122.
11. Терапевтическая стоматология. Национальное руководство / Под ред. Л.А. Дмитриевой, Ю.М. Максимовского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 888 с.
12. Жулев Е.Н., Серов А.Б. Способ исследования десневой жидкости // Патент РФ №2349920. Патентообладатель ГОУВПО НижГМА Росздрава. 2009. Бюл. № 54.
13. Haase H., Rink L. Multiple impacts of zinc on immune function. Metall. Integr. Biometal Sci. 2014. vol. 6. P.1175-1180.

14. Захарова В.В, Карзакова Л.М, Журавлева Н.В., Ухтерова Н.Д. Применение сульфата цинка при язвенной болезни // Врач. 2018. Т. 29. № 5. С. 57-59.
15. Prasad A.S., Bao B., Beck F.W., Sarkar F.H. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor - NF-κβ. Nutrition. 2011. vol. 27. P. 816-823.