

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β ПРИ ЗАТЯЖНОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ (РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ) ФОРМЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ (ГНОЙНОГО РИНОСИНУСИТА)

Азнабаева Л.Ф.^{1,3}, Шарипова Э.Р.¹, Арефьева Н.А.¹,
Зайнуллина А.Г.²

¹ Башкирский государственный медицинский университет

² Институт биохимии и генетики УфНЦ РАН

³ Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, г. Уфа

Резюме. У 62 пациентов с гнойным риносинуситом затяжного и рецидивирующего течения анализировали распределение аллельных вариантов полиморфных локусов –511 С>Т и +3953 С>Т гена интерлейкина-1 β (IL-1 β) и взаимосвязи между частотой их выявления, уровнями продукции эндогенного IL-1 β и склонности к рецидивированию заболевания. Полиморфизмы гена тестировали методами ПЦР и ПЦР-ПДРФ, способность к продукции IL-1 β определяли при стимуляции фитогемагглютинином клеток крови, количественный анализ выявления цитокина в супернатантах клеточных культур проводили методом иммуноферментного анализа. У большинства (более 70%) больных гнойным риносинуситом отмечалась недостаточная продукция эндогенного IL-1 β вне зависимости от склонности к рецидивированию заболевания. Установлено, что у больных гнойным риносинуситом гомозиготный низкопродуцирующий генотип *С/*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 β выявлялся в 2 раза чаще по сравнению с практически здоровыми лицами (82 человека). Определено увеличение фактора риска (OR = 3,4) формирования рецидивирования заболевания при выявляемости гомозиготного генотипа *С/*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 β . В группе больных с затяжным течением, но без рецидивов заболевания имела место лишь тенденция к увеличению показателя. Выявлена ассоциация низкой продукции эндогенного IL-1 β с гомозиготным генотипом *С/*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 β (OR = 3,4), а высокой продукции – с гетерозиготным – *С/*Т (OR = 7,6). Диагностическим маркером риска развития рецидивов заболевания является низкая про-

дукция IL-1 β , обусловленная носительством гомозиготного генотипа *С/*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 β . Патогенетически обусловленная терапия гнойных риносинуситов с затяжным и рецидивирующим течением рекомбинантным IL-1 β (Беталейкин, СПб ГосНИИОЧБ) является высокоэффективной, способствует сокращению количества рецидивов заболевания.

Ключевые слова: гнойный риносинусит, интерлейкин-1 β , генетика.

Адрес для переписки:

Азнабаева Лилия Фаритовна
Республиканская клиническая больница
им. Г.Г. Куватова.
450005, г. Уфа, ул. Достоевского, 132,
иммунологическая лаборатория.
Тел.: (3472) 272-62-23.
E-mail: aznabaeva@mail.ru
Шарипова Эльмира Рашитовна
E-mail: peppy14@rambler.ru

Aznabaeva L.F., Sharipova E.R., Arefyeva N.A., Zainullina A.G.

IMMUNOGENETIC PECULIARITIES OF IL-1 β SYNTHESIS IN THE PATIENTS WITH PROTRACTED AND CHRONIC (RECURRENT) BACTERIAL INFLAMMATION OF UPPER RESPIRATORY WAYS (RHINOSINUSITIS)

We have studied distribution of IL-1 β gene allelic variants (-511C>T polymorphism in promoter region and IL-1 β +3953C>T polymorphism in exon 5) in sixty-two patients with recurrent and protracted rhinosinusitis, as well as their intercorrelations between allele frequencies, IL-1 β levels and predisposal for recurrence of chronic rhinosinusitis (CR). DNA samples were genotyped using PCR-RFLP analysis. IL-1 β production by PHA-stimulated lymphocytes were determined in the cell supernates by means of quantitative enzyme immunoassay. In majority of patients (> 70%) with CR, decreased production of IL-1 β was found, irrespectively of disease recurrence. Frequency of a «low-producer» homozygous *C/*C genotype +3953C>T of IL-1 β gene was two-fold higher in the patients with CR than in healthy controls (OR=3.4). In patients with protracted, recurrence-free patients, this parameter showed only a tendency to increase. Decreased production of IL-1 β was associated with homozygous *C/*C genotype +3953C>T of IL-1 β gene (OR = 3,4), whereas high levels correlated with heterozygous C/*T genotype (OR = 7,6).

Thus, low IL-1 β production in carriers of homozygous *C/*C of +3953 polymorphic locus of IL-1 β gene represents a diagnostic marker reflecting a risk of recurrent disease. Hence, a pathogenesis-based therapy of purulent rhinosinusitis with protracted and recurrent clinical course is possible by means of recombinant IL-1 β (e.g., Betaleukin, St.Petersburg Institute for Highly Pure Biological Preparations), being a highly effective approach which favors decreased recurrence of disorder. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 535-540)

Риносинуситы – воспалительные заболевания носа и околоносовых пазух – относятся к патологии верхних дыхательных путей и наиболее распространены в оториноларингологической практике [5, 11]. Среди госпитализированных в ЛОР-отделения доля больных риносинуситом составляет от 29 до 60% [2, 3, 15]. Несмотря на совершенствование способов диагностики и терапии гнойных риносинуситов (ГРС), уровень их распространенности не уменьшается, более того, отмечается постоянное увеличение хронических форм заболевания [8, 10].

В настоящее время воспалительные заболевания ЛОР-органов длительного и резистентного к терапии течения, в том числе синуситы, относятся к проявлениям инфекционного синдрома, обусловленного иммунодефицитом [4], в основе которого лежат нарушения кинетики иммунного ответа [9, 13]. Важнейшая роль в обеспечении функционирования иммунной системы отводится межклеточным иммуномедиаторам (цитокинам), которые способствуют взаимодействию иммунокомпетентных клеток между собой и с другими клетками организма на различных этапах иммунного ответа. Одним из необходимых цитокинов для такого взаимодействия является IL-1, который синтезируется одним из первых в ответ на воздействие патогена [12]. Широко применяемые в клинической практике оториноларингологов препараты бактериальных лизатов реализуют свой иммуностропный эффект через способность стимулировать продукцию IL-1 [16]. Однако в условиях отсутствия активации продукции цитокина в ответ на воздействие бактериальных антигенов развивается толерантность [14], что клинически проявляется неудовлетворительными результатами лечения.

В настоящее время установлено, что гнойные риносинуситы с затяжным и хроническим течением в большинстве случаев сопровождаются недостаточностью продукции IL-1 β на системном уровне [1], причины развития которой практически не изучены.

Одним из механизмов регулирования продукции цитокинов является контроль на генном уровне. Имеются гены, ответственные за продукцию цитокинов, например, кластер гена IL-1 β находится на хромосоме 2q13-2q21 и имеет несколько полиморфных локусов. Полиморфизм локусов проявляется заменой одного нуклеотида на другой (например, в локусе +3953 С на Т) и реализуется в появлении как минимум трех генотипов данного локуса, а именно *C/*C, *C/*T и *T/*T. Генотип *C/*C характеризуется низкой, тогда как *T/*T – высокой продукцией цитокина [6]. В настоящее время остаются открытыми вопросы роли иммуногенетических особенностей в хронизации гнойного риносинусита.

Цель работы: определение иммуногенетических особенностей продукции интерлейкина-1 β в иммунопатогенезе формирования и лечении затяжного течения локального гнойного воспаления слизистых верхних дыхательных путей и при рецидивировании заболевания.

Задачи исследования:

1) Изучить особенности клинического течения гнойного риносинусита в зависимости от продукции IL-1 β .

2) Провести анализ ассоциаций двух полиморфных ДНК-локусов: -511C>T и +3953C>T в гене IL-1 β с данными продукции IL-1 больных гнойным риносинуситом и сопоставить с клиническим течением заболевания.

3) Разработать критерии прогноза — маркеры риска рецидивирования заболевания.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 62 больных гнойным риносинуситом, получавших лечение в ЛОР-отделении РКБ им. Г.Г. Куватова в период с 1998–2000 гг. У всех больных отмечалось нетипичное течение заболевания (длительность более 1 месяца) и устойчивость к традиционным методам лечения. Из них 31 пациент имели затяжное течение заболевания (более 1 месяца) без рецидивов и 31 — с рецидивирующим (обострения не менее 1 раз в год). Из них 28 пациентов, наряду с общепринятым лечением, получали рекомбинантный интерлейкин-1 β (Беталейкином, СПб, ГосНИИОЧБ), который вводили внутривенно, медленно, капельно, разведенным физиологическим раствором из расчета 5 нг/кг веса больного ежедневно в течение пяти дней. Предварительно у всех обследуемых больных были дренированы воспаленные пазухи.

Всем больным проводилось клиническое и лабораторное обследование. Изучались характер заболевания на момент поступления и в отдаленные сроки через 1 и 5 лет. Проводился осмотр ЛОР-органов, в том числе эндоскопия полости носа гибким эндоскопом «Olympus». Выполнялась рентгенография или компьютерная томография ОНП. Больные с анатомическими аномалиями полости носа, приводящими к окклюзии в области остиомеатального комплекса, из исследования исключались. Лабораторное обследование состояло в определении продукции эндогенного интерлейкина-1 β клетками крови при стимуляции фитогемагглютинином. Для количественного выявления цитокина в супернатантах клеточных культур использовали метод иммуноферментного анализа (тест-наборы ООО «Цитокин», СПб). Всем больным проводилось молекулярно-генетическое исследование. ДНК выделяли из крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Амплификацию локусов –511С>Т и +3953С>Т гена IL-1 β проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров («Силекс», Москва). Для определения нуклеотидных замен проводили гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующей рестриктазой (Ama87I и TaqI «СибЭнзим», г. Новосибирск). Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили электрофорезом в 7% полиакриламидном геле. Полученные результаты сопоставляли с данными 82 практически здоровых лиц. Оценка силы ассоциаций генотипа с продукцией IL-1 β и риском формирования

хронического гнойного воспаления проводилась с использованием показателя соотношения шансов (odds ratio, OR) по формуле $OR = (a*d)/(b*c)$. При OR более 1 ассоциацию расценивали как положительную (фактор риска). При OR менее 1 — как отрицательную (фактор устойчивости) [18].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования способности клеток крови больных гнойными формами риносинусита к продукции эндогенного IL-1 β показали большой разброс значений — от 156 до 2680 пг/мл, что свидетельствовало о различном функциональном состоянии иммунной системы в виде ее угнетения, отсутствия или наличия активации. Соответственно этому все больные были разделены на 3 группы. В основе создания групп лежала формула, позволяющая оценить степень отклонения показателя больного от среднеарифметического значения показателя в группе практически здоровых лиц (М) [7].

I группу (31%) составили больные, у которых показатели отличались от значений М на 33–66% в меньшую сторону (менее 340,58 пг/мл) и соответствовали II степени отклонений, требуя специального отношения (II степень недостаточности). II группу (39%) — больные, у которых показатели не отличались от данных практически здоровых лиц и находились в пределах от 340,58 до 676,08 пг/мл. III группу (30%) больных составили пациенты, у которых показатели отличались в большую сторону от значений М на 33–66% (в пределах от 676,08 до 843,83 пг/мл) (II и III степень гиперпродукции цитокина).

Известно, что для адекватного воспаления требуется активация сети провоспалительных факторов, поэтому отсутствие увеличения продукции одного из основных провоспалительных цитокинов у лиц I и II групп рассматривали как недостаточность продукции IL-1 β . Сопоставление результатов продукции цитокина с данными иммунограмм подтвердило высказанное предположение. Так, у лиц I и II групп были выявлены сниженные показатели практически во всех звеньях иммунной системы, более выраженные у больных со сниженной продукцией IL-1 β . В обеих группах была выявлена Т-клеточная недостаточность и низкая способность нейтрофилов очага воспаления к адгезии. Тогда как у больных III группы изменения были минимальными и касались преимущественно метаболических свойств нейтрофилов [1]. Таким образом, у 70% пациентов гнойным риносинуситом отмечалась неадекватная воспалению продукция эндогенного IL-1 β , что

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ –511С>Т И +3953С>Т ГЕНА IL-1 β У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ ГНОЙНЫМ РИНОСИНОСИТОМ

Генотипы	Исследуемые группы	
	Практически здоровые лица, n = 82	Больные гнойным риносинуситом, n = 62
–511С>Т		
*С/*С	36	40
*С/*Т	53	47
*Т/*Т	11	13
Всего	100	100
+3953С>Т		
*С/*С	46	66*
*С/*Т	49	29
*Т/*Т	5	5
Всего	100	100

Примечание: * – показатели отличаются от данных практически здоровых лиц ($\chi^2 = 4,29$, $P = 0,039$, $OR = 2,16$).

реализовалось в недостаточности иммунного реагирования.

Оценка частоты выявляемости недостаточной продукции цитокина (IL-1 β) в зависимости от клинического течения заболевания свидетельствовала об отсутствии выраженных отличий в исследуемых группах – низкие значения продукции в группе больных с затяжным течением выявлялись у 76%, в группе с рецидивирующим течением – у 78%. Полученные результаты свиде-

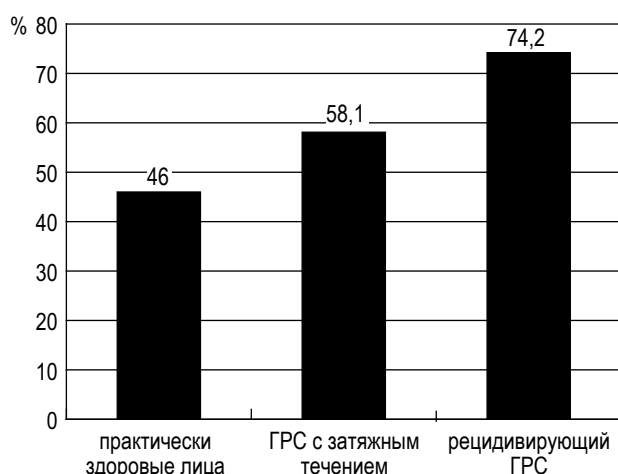


Рисунок 1. Частота выявляемости низкопродуцирующего генотипа *С/*С локуса +3953С>Т гена IL-1 β у больных гнойным риносинуситом (ГРС) в зависимости от наличия рецидивирования заболевания (%)

тельствуют о наличии недостаточности цитокинового реагирования у большинства больных с нетипичным клиническим течением, вне зависимости от наличия рецидивирования заболевания.

Для определения возможной роли генетической предрасположенности к развитию нетипичного клинического течения заболевания и его рецидивирования было проведено молекулярно-генетическое исследование двух известных полиморфных локусов гена IL-1 β : –511С>Т и +3953С>Т. Анализ распределения частот различных генотипов показал наличие ассоциации заболевания только с полиморфным локусом +3953С>Т. Полученные данные представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы, среди больных с нетипичным течением гнойного риносинусита достоверно чаще выявляется низкопродуцирующий генотип *С/*С локуса +3953С>Т гена IL-1 β . Однако при проведении анализа ассоциаций генотипа с клиническими особенностями течения заболевания было установлено, что низкопродуцирующий генотип достоверно часто выявлялся только в группе больных с рецидивирующим течением ($\chi^2 = 6,2$, $P = 0,013$, $OR = 3,4$) (рис. 1).

Как видно из рисунка 1, в группе с затяжным течением без рецидивирования заболевания отмечалась лишь тенденция к увеличению показателя (58% против 46%; $\chi^2 = 0,92$, $P = 0,33$, $OR = 1,64$).

Оценка корреляционной зависимости показателей продукции IL-1 β и варианта генотипа не выявила прямой зависимости. Однако проведение анализа ассоциаций низкопродуцирующего генотипа *С/*С локуса +3953С>Т гена IL-1 β у больных гнойным риносинуситом с низкой продукцией IL-1 β показал, что генотип *С/*С выявлялся значительно чаще по сравнению с группой больных с высокой продукцией цитокина и практически здоровыми лицами (соответственно, 74% против 38% и 46%; $\chi^2 = 5,46$, $P = 0,02$, $OR = 3,4$ и $\chi^2 = 6,2$, $P = 0,013$, $OR = 3,4$) (рис. 2).

Следовательно, низкая продукция цитокина ассоциирована с низкопродуцирующим генотипом *С/*С локуса +3953С>Т гена IL-1 β . Высокая продукция IL-1 β была ассоциирована с генотипом *С/*Т ($\chi^2 = 6,06$, $P = 0,01$, $OR = 7,6$), но не с высокопродуцирующим генотипом *Т/*Т. В целом генотип *Т/*Т как среди больных ГРС, так и практически здоровых лиц встречался редко (около 12%). Полученные данные позволяют высказать предположение, что при локальном гнойном воспалении слизистых верхних дыхательных путей адекватная продукция IL-1 β ассоциирована с генотипом *С/*Т.

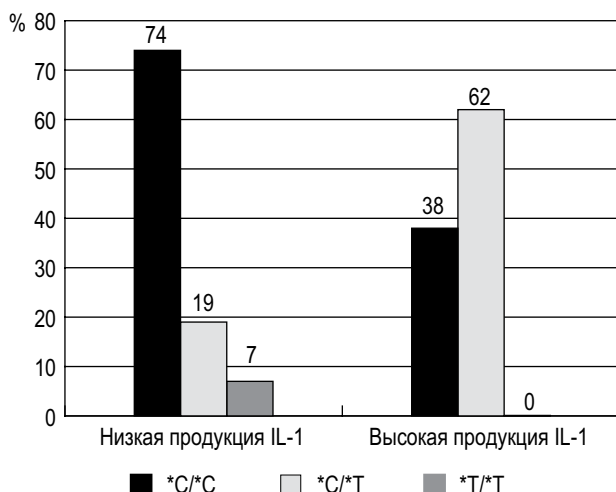


Рисунок 2. Частота полиморфного локуса +3953C>T гена IL-1 β у больных гнойным риносинуситом в зависимости от способности клеток крови к продукции IL-1 β

Включение в лечение больных ГРС со склонностью к хронизации воспалительного процесса рекомбинантного интерлейкина-1 β показало высокую клиническую эффективность. Непосредственно после лечения практически у всех отмечалось завершение воспалительного процесса. При этом у половины больных клиническое выздоровление наступало на 3-4 сутки лечения. Тогда как при традиционных методах терапии в эти сроки наблюдалось только начало улучшения состояния больных. Более того, в 20% случаев лечение практически не имело положительной динамики.

Оценка отдаленных результатов лечения показала преимущество заместительной цитокино-терапии (рис. 3).

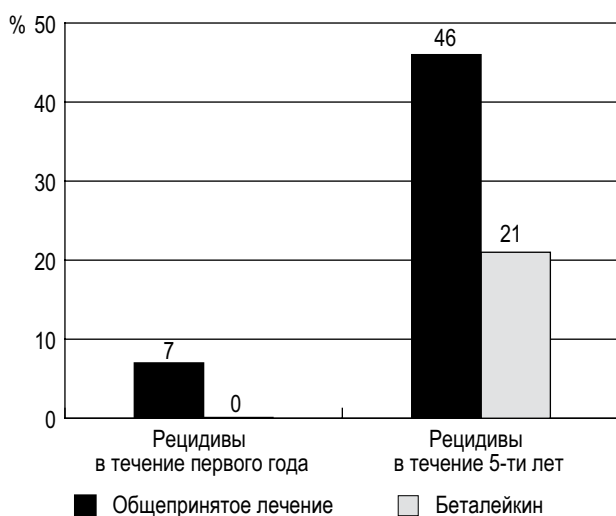


Рисунок 3. Рецидивирование гнойного риносинусита в зависимости от проведенного лечения

Как видно из рисунка 3, включение в схему лечения рекомбинантного интерлейкина-1 β способствовало сокращению рецидивов заболевания (21% против 46%). Отмечено, что среди рецидивирующих больных у большинства (61%) имела генетически обусловленная недостаточность продукции IL-1 β .

Таким образом, установлены клиничко-иммунологические особенности течения гнойного риносинусита – недостаточная продукция провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β способствует формированию затяжного и рецидивирующего течения заболевания. Выявлена генетическая обусловленность рецидивирующего течения гнойного риносинусита, связанная с полиморфным локусом +3953 C>T гена IL-1 β . Прогностическим критерием риска развития рецидивирующего течения заболевания является сочетание низких значений продукции интерлейкина-1 β и выявление низкопродукующего гомозиготного генотипа *C/*C +3953 гена IL-1 β . Лечение больных гнойным риносинуситом с затяжным и хроническим течением рекомбинантным интерлейкином-1 β является патогенетически обусловленным, способствует повышению клинической эффективности проводимой терапии и сокращению рецидивов.

Список литературы

1. Азнабаева Л.Ф. Провоспалительные цитокины в иммунопатогенезе и лечении хронических гнойных риносинуситов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2002. – 37 с.
2. Арефьева Н.А., Абдурашитов Р.Ш., Янборисов Т.М., Шарипов Р.А. Риногенный синусит: Метод. рекоменд. – Уфа, 1997. – 19 с.
3. Гофман В.Р., Смирнов В.С. Состояние иммунной системы при острых и хронических заболеваниях ЛОР-органов // Иммунодефицитные состояния / Под ред. В.С. Смирнова и И.С. Фрейдлин. – СПб., 2000. – С. 163-187.
4. Гришина Т.И., Пухальский А.Л. Основы иммунодиагностики // Клинич. иммунология: Руководство для врачей / Под ред. Е.И. Соколова. – М.: Медицина, 1998. – С. 57-78.
5. Егорова В.Н., Плужников М.С., Лавренива Г.В. Монотерапия острых гнойных синуситов при местном применении Ронколейкина – рекомбинантного интерлейкина-2 человека // Terra Medica Nova. – 2000. – № 1 (17). – С. 29-31.
6. Коненков В.И., Смольникова М.И. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Мед. иммунология. – 2003. – Т. 5, № 1-2. – С. 11-28.

7. Лившиц В.М., Сидельникова В.И. Медицинские лабораторные анализы: Справочник. — М.: Триада-Х, 2000. — С. 137.
8. Лопатин А.С. Минимально инвазивная эндоскопическая хирургия заболеваний полости носа, околоносовых пазух и носоглотки: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Л., 1998. — 42 с.
9. Нестерова И.В. Программа иммунореабилитации больных вторичными иммунодефицитами // *Int. J. Immunorehabilit.* — 1998. — № 9. — С. 40-45.
10. Пискунов С.З., Пискунов Г.З. Диагностика и лечение воспалительных процессов слизистой оболочки носа и околоносовых пазух. — Воронеж: Издательство ВГУ, 1991. — 184 с.
11. Плужников М.С., Лавренева Г.В., Галкина О.В. и др. Местное применение роколейкина при острых гнойных риносинуситах // *Мед. иммунология.* — 1999. — Т. 1, № 3-4. — С. 128.
12. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Биологические свойства и перспективы применения в клинике // *Новости оториноларингологии и логопатологии.* — 1997. — № 4 (12). — С. 10-15.
13. Фрейдлин И.С. Кинетика воспаления и иммунного ответа // *Мед. иммунология.* — 1999. — Т. 1, № 3-4. — С. 25-26.
14. Фрейдлин И.С. Цитокины в клинике // *Совр. пробл. аллергологии, клинич. иммунологии и иммунофармакологии: Сб. тр. 2-го Нац. Конгресса РААКИ.* — М., 1998. — С. 104-112.
15. Шеврыгин Б.В. Синусит у детей и взрослых. — М.: Медицина, 1998. — 256 с.
16. Guenounon M., Vacheron F., Nauciel C. Interleukin-1 a mediator of immunoadjuvant peptidoglycans // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* — 1985. — Vol. 8, N 3-4. — P. 273-284.
17. Santtila S., Savinainen K., Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is Associated with enhanced IL-1 β Production in vitro // *Scan. J. Immunol.* — 1998. — Vol. 47. — P. 195-198.
18. Schlesselman J. Case-control studies: Design, conduct, analysis. — N. Y., Oxford: Oxford University Press. — 1982. — P. 58-96.

поступила в редакцию 29.01.2007

принята к печати 08.06.2007