

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

Азнабаева Л.Ф.<sup>1,3</sup>, Шарипова Э.Р.<sup>1</sup>, Арефьева Н.А.<sup>1</sup>,  
Зайнуллина А.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет

<sup>2</sup> Институт биохимии и генетики УфНЦ РАН

<sup>3</sup> 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 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и взаимосвязи между частотой их выявления, уровнями продукции эндогенного IL-1 $\beta$  и склонности к рецидивированию заболевания. Полиморфизмы гена тестировали методами ПЦР и ПЦР-ПДРФ, способность к продукции IL-1 $\beta$  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 $\beta$  вне зависимости от склонности к рецидивированию заболевания. Установлено, что у больных гнойным риносинуситом гомозиготный низкопродуцирующий генотип \*С/\*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 $\beta$  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 $\beta$ . В группе больных с затяжным течением, но без рецидивов заболевания имела место лишь тенденция к увеличению показателя. Выявлена ассоциация низкой продукции эндогенного IL-1 $\beta$  с гомозиготным генотипом \*С/\*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 $\beta$  (OR = 3,4), а высокой продукции – с гетерозиготным – \*С/\*Т (OR = 7,6). Диагностическим маркером риска развития рецидивов заболевания является низкая продукция IL-1 $\beta$ , обусловленная носительством гомозиготного генотипа \*С/\*С полиморфного локуса +3953 гена IL-1 $\beta$ . Патогенетически обусловленная терапия гнойных риносинуситов с затяжным и рецидивирующим течением рекомбинантным IL-1 $\beta$  (Беталейкин, СПб ГосНИИОЧБ) является высокоэффективной, способствует сокращению количества рецидивов заболевания.

## 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

Ключевые слова: гнойный риносинусит, интерлейкин-1 $\beta$ , генетика.

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

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

We have studied distribution of IL-1 $\beta$  gene allelic variants (-511C>T polymorphism in promoter region and IL-1 $\beta$  +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 $\beta$  levels and predisposal for recurrence of chronic rhinosinusitis (CR). DNA samples were genotyped using PCR-RFLP analysis. IL-1 $\beta$  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 $\beta$  was found, irrespectively of disease recurrence. Frequency of a «low-producer» homozygous \*C/\*C genotype +3953C>T of IL-1 $\beta$  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 $\beta$  was associated with homozygous \*C/\*C genotype +3953C>T of IL-1 $\beta$  gene (OR = 3,4), whereas high levels correlated with heterozygous C/\*T genotype (OR = 7,6).

Thus, low IL-1 $\beta$  production in carriers of homozygous \*C/\*C of +3953 polymorphic locus of IL-1 $\beta$  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 $\beta$  (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 иммуностимулирующий 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  в иммунопатогенезе формирования и лечения 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 $\beta$ .

2) Провести анализ ассоциаций двух полиморфных ДНК-локусов: -511C>T и +3953C>T в гене IL-1 $\beta$  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 $\beta$  (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 $\beta$  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 -511C>T и +3953C>T гена IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$ . 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 $\beta$ . В обеих группах была выявлена T-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 $\beta$ , что

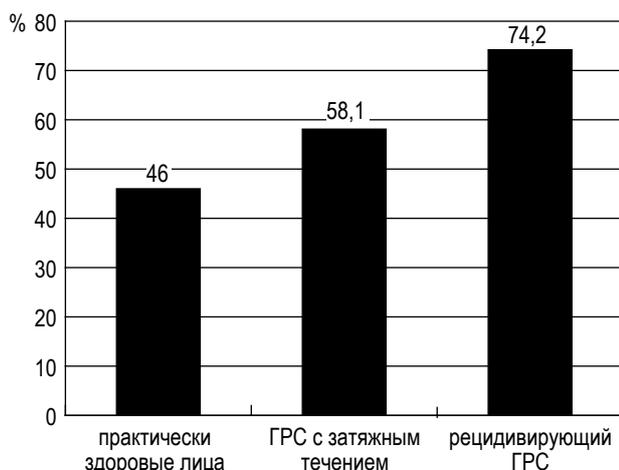
**ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ -511С>Т И +3953С>Т ГЕНА IL-1 $\beta$  У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ ГНОЙНЫМ РИНОСИНОСИТОМ**

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 $\beta$ ) 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 низкопродуктивного генотипа \*С/\*С локуса +3953С>Т гена IL-1 $\beta$  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.

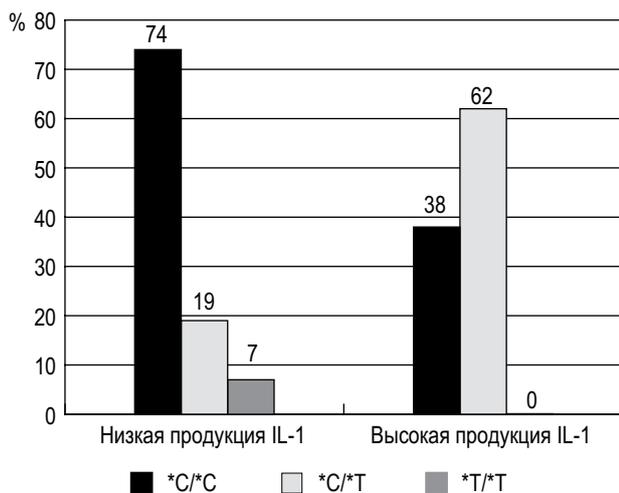
Для определения возможной роли генетической предрасположенности к развитию нетипичного клинического течения заболевания и его рецидивирования было проведено молекулярно-генетическое исследование двух известных полиморфных локусов гена IL-1 $\beta$ : -511С>Т и +3953С>Т. Анализ распределения частот различных 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 низкопродуктивный генотип \*С/\*С локуса +3953С>Т гена IL-1 $\beta$ . Однако при проведении анализа ассоциаций генотипа с клиническими особенностями течения заболевания было установлено, что низкопродуктивный 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 $\beta$  и варианта генотипа не выявила прямой зависимости. Однако проведение анализа ассоциаций низкопродуктивного генотипа \*С/\*С локуса +3953С>Т гена IL-1 $\beta$  у больных гнойным риносинуситом с низкой продукцией IL-1 $\beta$  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).

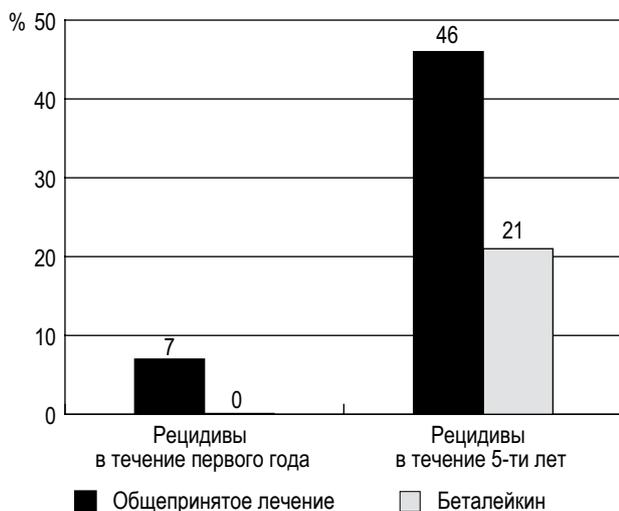
Следовательно, низкая продукция цитокина ассоциирована с низкопродуктивным генотипом \*С/\*С локуса +3953С>Т гена IL-1 $\beta$ . Высокая продукция IL-1 $\beta$  была ассоциирована с генотипом \*С/\*Т ( $\chi^2 = 6,06$ ,  $P = 0,01$ ,  $OR = 7,6$ ), но не с высокопродуктивным генотипом \*Т/\*Т. В целом 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 $\beta$  ассоциирована с генотипом \*С/\*Т.



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

Включение в лечение больных ГРС со склонностью к хронизации воспалительного процесса рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  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 $\beta$  способствовало сокращению рецидивов заболевания (21% против 46%). Отмечено, что среди рецидивирующих больных у большинства (61%) имелась генетически обусловленная недостаточность продукции IL-1 $\beta$ .

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