

УДК 616.211 – 002.2; 616.216.1 – 002

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ХГРС, РЕАЛИЗУЕМЫЕ БЕЛКОМ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP-70 И АУТОАНТИТЕЛАМИ К НЕМУ

Егорова Е. В., Пересторонин В. И., Цыбиков Н. Н.

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», Чита, Россия, 672090 г. Чита, ул. Горького, 39а.

У здоровых лиц и у больных хроническим гнойным риносинуситом (ХГРС) определяли уровень белка теплового шока (HSP-70) и аутоантител к нему в сыворотке крови и назальном секрете до и после лечения предложенной оригинальной методикой, основанной на предварительной экстракорпоральной активации аутолейкоцитов. Выяснилось, что как сами стресс-белки, так и аутоантитела к ним определяются в высокой концентрации у здоровых и у больных ХГРС. На фоне традиционной терапии содержание HSP-70 в сыворотке крови увеличивается в 2,6 раза, а в назальном секрете в 4 раза. После терапии «оригинальным» методом концентрация HSP-70 значительно возрастает как в сыворотке крови (в 9 раз), так и в назальном секрете (в 15 раз). Также выявлены сдвиги содержания аутоантител к БТШ-70 в сыворотке крови: на фоне лечения традиционным способом уровень аАт уменьшается в 1,8 раза, при проведении оригинальной терапии – в 2,3 раза.

Ключевые слова: хронический гнойный риносинусит, стресс-белки, HSP-70, аутоантитела, иммунотерапия.

MECHANISMS OF HPRS PATHOGENESIS ARE CAUSED BY THE HEAT SHOCK PROTEIN HSP-70 AND AUTOANTIBODIES TO IT

Egorova E. V., Perestoronin V. I., Tsybikov N. N.

Chita State Medical Academy, Chita, Russia, 672090, Gorky st., 39a.

In healthy individuals and patients with chronic purulent rhinosinusitis (HPRS) the level of heat shock protein (HSP-70), and antibodies to it in serum and nasal secretions. Determination was carried out before and after treatment of the original proposed method, based on a preliminary extracorporeal activation of autoleukocytes. It was found that both the stress proteins and autoantibodies to it are defined at a high concentration in healthy and HPRS. In conventional therapy HSP-70 content in the blood serum is increased by 2.6 times, and in nasal secretions in 4 times. After therapy "original" concentration of HSP -70 increases significantly, both in serum (9 times), and nasal secretions (15 times). Also identified changes of the content of autoantibodies HSP-70 in serum: after treatment with the traditional way the level of AAB decreased by 1.8 times, during the original treatment - by 2.3 times.

Key words: Chronic purulent rhinosinusitis, heat shock proteins, HSP-70, autoantibodies, immunotherapy.

Известно, что одной из причин развития хронического гнойного риносинусита (ХГРС) является иммунная недостаточность как на системном, так и местном уровне [1, 2, 7]. Основным методом в лечении обострения ХГРС является системная антибактериальная терапия, длительное применение которой сопровождается повышением резистентности микроорганизмов и рецидивирующим течением [4, 6].

Исходя из сказанного, очевидно, что раскрытие новых звеньев механизма развития ХГРС представляется актуальным, так как открывает перспективы новых путей патогенетической терапии этого заболевания. Доказано, что белок теплового шока (БТШ, HSP-70, шаперон, стресс-белок) экспрессируется на клетках слизистой носа и микроорганизмах. Стресс-белок обладает не только защитными свойствами, но и способен

запускать новые звенья патогенеза ХГРС, так как, являясь высокоиммуногенным, может индуцировать выработку аутоантител (аАт) [5].

До настоящего времени роль БТШ как в механизмах создания местной резистентности, так и его участие в развитии патологического процесса в полости носа и ОНП, практически не исследовалось, что и составило предмет нашего исследования.

Цель работы – оценить уровень HSP-70, аАт классов IgG и sIgA к нему в сыворотке крови и назальном секрете у здоровых и больных ХГРС до и после лечения.

Материалы и методы исследования

Под нашим наблюдением находилось 20 больных ХГРС в возрасте от 18 до 55 лет. Контрольная группа состояла из 20 здоровых лиц без сопутствующей и ЛОР патологии.

Материалом для иммунологического исследования служили сыворотка крови и назальный секрет здоровых и больных ХГРС до и после лечения. Для получения смывов из полости носа пациенту в каждый общий носовой ход на 10 минут вводили сухой ватный тампон, который после извлечения переносили в пробирку, содержащую 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Через 30 мин тампоны тщательно отжимали, и полученный смыв использовали для определения HSP-70, аутоантител (аАт) классов IgG и sIgA к нему [3]. Концентрацию HSP-70 в сыворотке крови определяли моноклональными антителами методом ИФА (BCM Diagnostics, USA). Уровень аАт класса IgG в сыворотке крови и sIgA в назальном секрете определяли оригинальным методом. Лунки полистероловых планшетов сенсibilизировали HSP-70 (Assay Designs., USA, Michigan) в количестве 20 мкг в объеме 200 мкл забуференного физиологического раствора. После 30 минутной инкубации при комнатной температуре планшет трижды отмывали дистиллированной водой, затем вводили 200 мкл исследуемой сыворотки или смыва полости носа, разведенных в соотношении 1:100 забуференным физиологическим раствором и после инкубации вновь трижды отмывали лунки планшетов. Аутоантитела к HSP-70 выявляли анти-IgG-человеческими антителами (Вектор-Бест, Новосибирск) в сыворотке крови и анти - sIgA (вектор-Бест) в смывах по стандартной методике. Полученные результаты выражали в единицах оптической плотности.

Традиционный метод включал назначение системного антибиотика, антигистаминных препаратов, сосудосуживающих капель в нос, ирригационную терапию и по показаниям пункцию гайморовой пазухи или «ЯМИК – метод». За основу предлагаемой нами схемы лечения был взят запатентованный способ Н. Ю. Логиной «Способ лечения хронических рецидивирующих заболеваний слизистой носа и околоносовых пазух методом эндоназальной аутолимфоцитотерапии» (патент RU 2403071 С1), включающий получение аутологичных лимфоцитов из венозной крови больного, их культивирование совместно с

иммуномодулятором и введение в придаточные пазухи носа, посредством установленного ЯМИК-катетера, после предварительной эвакуации содержимого. Ввиду сложности и дороговизны процесса получения аутологичных лимфоцитов было предложено некоторое упрощение указанной методики. Ежедневно, на протяжении всего курса лечения, у пациентов в утренние часы забирали кровь из локтевой вены в пробирки с гепарином. В полученные образцы добавляли 0,01 % раствор тимогена (10 мкг на 1мл крови) и инкубировали пробирки в течение часа при комнатной температуре, затем центрифугировали при 1500 об/мин. При помощи микродозатора из пробирок забирали две верхние фракции – плазму крови и слой лейкоцитов, разводили физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вводили пациентам в околоносовые пазухи. Необходимо отметить, что описанный способ терапии проводили на фоне продолжающегося «стандартного» медикаментозного лечения.

Статистическая обработка данных осуществлена при помощи пакета программ «Biostat» и Microsoft Excel 2003 (Microsoft Office 2003 for Windows XP Professional). При сравнении показателей иммуноглобулинов использовались методы непараметрической статистики, в связи с ненормальным распределением значений в вариационных рядах. Числовые данные приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-го; 75-го процентилей). Для сравнения двух независимых выборочных совокупностей применялся критерий Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

Содержание HSP-70 в сыворотке здоровых людей составило 0,17 нг/мл, а в назальном секрете 0,05 нг/мл. У больных ХГРС резко возрастает уровень HSP-70 в сыворотке крови в 3,8 раза, а в назальном секрете повышается в 3,2 раза (табл. 1).

Таблица 1

Уровень HSP-70 в сыворотке крови и назальном секрете у здоровых и больных хроническим гнойным риносинуситом

Параметры нг/мл	Здоровые n=20	ХГРС n=20
HSP-70 в сыворотке крови	0,17 (0,08; 0,32)	0,65 (0,50; 0,74) p<0,001
HSP-70 в назальном секрете	0,05 (0,01; 0,07)	0,16 (0,09; 0,31)

Примечание: n – число обследованных; p – уровень значимости достоверных различий по сравнению с контролем; p1 – уровень значимости достоверных различий до и после лечения.

Нами показано, что на фоне как традиционной, так и особенно оригинальной терапии концентрация HSP-70 значительно возрастает как в сыворотке крови, так и назальном секрете (табл. 2). Так, после проведения традиционной терапии содержание HSP-70 в сыворотке крови увеличивается в 2,6 раза, а в назальном секрете в 4 раза. При оригинальном методе лечения – в 9 раз и 15 раз соответственно.

Таблица 2

Содержание БТШ-70 в сыворотке крови и назальном секрете больных ХГРС до и после лечения

Параметры пг/мл	Здоровые n=20	ХГРС до лечения n=20	ХГРС после лечения n=20	
			традиционное	оригинальное
БТШ-70 в сыворотке крови	0,17 (0,08; 0,32)	0,65 (0,50; 0,74)	1,7±0,25	2,64±0,40
БТШ-70 в назальном секрете	0,05 (0,01; 0,07) P<0,05	0,16 (0,09; 0,31)	1,5±0,23	2,49±0,37

Примечание: n – число обследованных; p – уровень значимости достоверных различий по сравнению с контролем.

Увеличение уровня этого шаперона может свидетельствовать, с одной стороны, усилением секреции БТШ-70 микроорганизмами, которые повреждаются факторами местной резистентности, в том числе лейкоцитами, активированными тимогеном. Другим источником HSP-70, безусловно, являются клетки (макрофаги, моноциты), в сумме отражающие воспалительные реакции.

Как видно из таблицы 3, у здоровых лиц аАт к HSP-70 обнаруживались как в сыворотке крови, так и назальном секрете примерно в одинаковых концентрациях. У больных ХГРС зарегистрирован максимальный уровень sIgA относительно HSP-70 в сыворотке крови, а в назальном секрете он практически не отличается от нормы.

Таблица 3

Уровень аАт к HSP-70 в сыворотке крови и назальном секрете у здоровых и больных хроническим гнойным риносинуситом

Параметры нг/мл	Здоровые n=20	ХГРС до лечения n=20
аАт класса IgG к HSP -70 в сыворотке крови	0,11±0,05	0,55±0,11 p<0,001

аАт класса sIgA к HSP -70 в назальном секрете	0,14±0,02	0,13±0,01
---	-----------	-----------

Примечание: n – число обследованных; p – уровень значимости достоверных различий до и после лечения.

Таблица 4

Уровень аАт к HSP-70 в сыворотке крови и назальном секрете у больных хроническим гнойным риносинуситом после проведения традиционной и оригинальной терапии

Параметры нг/мл	ХГРС Традиционная терапия n=20	ХГРС Оригинальная терапия n=20
аАт класса IgG к HSP -70 в сыворотке крови	0,4□0,04	0,24□0,04
аАт класса sIgA к HSP -70 в назальном секрете	0,3□0,05	0,5□0,08

Примечание: n – число обследованных; p – уровень значимости достоверных различий до и после лечения.

Таким образом, значительное повышение HPS-70 как в сыворотке крови, так и назальном секрете при ХГРС объяснимо и связано с гиперпродукцией HSP-70 как фагоцитирующими клетками, так и микроорганизмами. Вероятно, в продукции белка теплового шока принимают участие и другие клетки в очаге воспаления: эндотелиоциты, эпителиальные и клетки соединительной ткани, вовлекаемые в патологические процессы.

Наряду со сказанным уровень аАт IgG к HSP-70 в сыворотке крови возрастает в 5 раз, в то время как в назальном секрете аАт sIgA не меняются. В первом варианте увеличение аАт IgG не вызывает удивления, так как HSP-70, являясь эволюционно устойчивыми белками, вызывают ожидаемый гипериммунный ответ, что и проявляется повышением сывороточных аАт практически в 5 раз. Местно в полости носа нет увеличенной продукции аАт sIgA, что, по нашему мнению, объясняется постоянным присутствием микроорганизмов на слизистой полости носа и формированием иммунной толерантности.

На фоне лечения уровень аАт в сыворотке крови уменьшается в 1,8 раз у больных, которых лечили традиционно и в 2,3 раза при проведении оригинальной терапии. В носовом секрете, с точностью до наоборот, увеличивается содержание аАт к БТШ.

Список литературы

1. Азнабаева Л. Ф. Циклоферон в терапии ринита и синусита / Л. Ф. Азнабаева, Н. А. Арефьева, А. Л. Коваленко. – СПб., 2000. – 40 с.
2. Арефьева Н. А. Иммунологические аспекты в оториноларингологии / Н. А. Арефьева, Ю. А. Медведев // Новости оториноларингологии и логопатологии. – 1997. – № 4 (12). – С- 3-10.
3. Смирнова И. Н. Противовоспалительное действие ингаляций минеральных вод: целесообразность определения биохимических маркеров воспаления в назальном секрете / И. Н. Смирнова, Т. Н. Зарипова, Д. И. Кузьменко // Вопросы курортологии. – 2003. – № 4. – С. 20-23.
4. Особенности реагирования местного иммунитета слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух при гнойных риносинуситах / А. А. Тотолян [и др.] // Рос. Оториноларингология. – 2004. – № 6. – С. 111-114.
5. Содержание белка теплового шока-70 и аутоантител к нему при лечении одонтогенных абсцессов / Н. Н. Цыбиков [и др.] // Амбулаторная хирургия. – 2010. – N 1. – С. 49-51.
6. Шарипова Э. Р. Перспективы применения рекомбинантных цитокинов в лечении гнойных риносинуситов / Э. Р. Шарипова Н. А. Арефьева, Л. Ф. Азнабаева // Рос. ринология. – 2009. - № 2. – С. 23-24.
7. Abbanat D. Chronic sinusitis: risk factors for extensive disease / D. Abbanat, M. Macielag, K. Bush // Expert Opin. Investig Drugs. – 2003. – № 12. – P. 379-399.

Рецензенты:

Кузник Борис Ильич, д-р мед. наук, профессор, почетный заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВО ЧГМА Минздравсоцразвития Российской Федерации, г. Чита.

Степанов Александр Валентинович, д-р мед. наук, заведующий кафедрой Безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф ГБОУ ВПО ЧГМА Минздравсоцразвития Российской Федерации, г. Чита.