

<https://doi.org/10.17116/otorino201883234-37>

## Распределение интерлейкинов и цитокинов в слизистой оболочке носа и носоглотки при изолированном синдроме постназального затекания

Г. СУМЕРАГА\*, М. ПИЛМАНЕ, Л. КИСЕ

Рижский университет им. П. Страдина, Рига, Латвия, LV-1002

Синдром постназального затекания — это состояние неизвестной этиологии и патогенеза. Хотя клинических свидетельств хронического воспаления или аллергии в слизистой оболочке верхних дыхательных путей при этом нет, может наблюдаться изменение уровня и распределения в слизистой оболочке носа и носоглотки интерлейкинов, цитокинов и противомикробных белков. Цель исследования — изучить содержание интерлейкинов, цитокинов, нейропептидов и противомикробных белков в слизистой оболочке носа и носоглотки пациентов с изолированным синдромом постназального затекания. Обследованы 20 пациентов с изолированным синдромом постназального затекания и 20 добровольцев из контрольной группы. В образцах слизистой оболочки носа и носоглотки с помощью иммуногистологических методов определяли белковый продукт гена 9,5, интерлейкинов 6 и 10, фактора некроза опухоли- $\alpha$ , нуклеарного фактора  $\kappa\text{B}$ ,  $\beta$ -дефенсина. Установлено, что синдром постназального затекания характеризуется повышенным содержанием белкового продукта гена 9,5, интерлейкина-6, интерлейкина-10, нуклеарного фактора  $\kappa\text{B}$  и  $\beta$ -дефенсина в слизистой оболочке носа и носоглотки.

*Ключевые слова:* белковый продукт гена 9,5, интерлейкин-6, интерлейкин-10, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , нуклеарный фактор  $\kappa\text{B}$ ,  $\beta$ -дефенсин.

## The distribution of interleukins and cytokines in the mucous membranes of the nose and the nasopharynx in the patients presenting with the post-nasal drip syndrome

G. SUMERAGA, M. PIELMANE, L. KISE

P. Stradin' Riga University, Riga, Latvia, LV-1002

The objective of the present study was to elucidate the distribution of interleukins and cytokines in the mucous membranes of the nose and the nasopharynx in the patients presenting with the post-nasal drip syndrome. The study included 20 patients with this pathological condition and 20 volunteers who comprised the control group. The samples of the mucous membranes of the nose and the nasopharynx were examined with the use of the immunohistochemical methods to identify the protein gene product 9.5, interleukin-6, interleukin-10, the tumour necrosis factor- $\alpha$ , nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , and beta-defensin. It was shown that the post-nasal drip syndrome is characterized by the enhanced content of the protein gene product 9.5, interleukin-6, interleukin-10, the tumour necrosis factor- $\alpha$ , nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , and beta-defensin in the mucous membranes of the nose and the nasopharynx.

*Keywords:* post-nasal drip syndrome, the protein gene product 9.5, interleukin-6, interleukin-10, tumour necrosis factor- $\alpha$ , nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , and beta-defensin.

Дискуссии по поводу определения и этиологии синдрома постназального затекания ведутся уже более 200 лет [1]. Многие врачи изучали синдром постназального затекания как клиническое состояние, при котором у пациентов наблюдается постназальное отделение слизи и имеются жалобы на кашель или ощущение инородного тела в горле при отсутствии аллергии, воспаления пазух и других заболеваний [2]. Этиология и патогенез этого синдрома неизвестны.

Белковый продукт гена 9,5 (PGP 9.5) — это нейрон-специфический белок, который обычно локализуется в нейронах и нервных волокнах центральной и периферической нервной системы. В перибронхиальных тканях PGP 9.5 действует в качестве общего нейронного маркера,

что дает основания предполагать морфологические причины возможной нейронной модуляции слизистых оболочек дыхательных путей и патофизиологических изменений в легких [3].

Интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-10 (IL-10) — одни из самых важных медиаторов и модуляторов воспаления. Провоспалительный цитокин IL-6 вызывает повышенную проницаемость сосудов, действует как фактор роста В-лимфоцитов и инициирует Т-клеточную иммунную реакцию на антиген. К тому же IL-6 действует как защитник во время интенсивного прогрессирования воспаления, например во время аллергических реакций, включая подавление экспрессии провоспалительного цитокина [4].

Противовоспалительный медиатор IL-10 может вырабатываться различными клетками, включая Т-лимфоциты, макрофаги и эндотелиальные клетки. IL-10 отрицательно влияет на высвобождение провоспалительных цитокинов при спровоцированном аллергеном воспалении дыхательных путей и неспецифической реакции дыхательных путей [5]. К тому же экспрессия IL-10 негативно коррелирует со степенью тяжести аллергического ринита.

Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) — это цитокин, имеющий несколько вариантов действия. При аллергии TNF- $\alpha$  индуцирует выработку Th2-цитокинов и активизирует миграцию Th2-клеток. При остром воспалении TNF- $\alpha$  является медиатором острой воспалительной реакции на различные микробы. TNF- $\alpha$  также отвечает за большинство системных осложнений, связанных с тяжелыми инфекциями [6].

Нуклеарный фактор  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) и  $\beta$ -дефенсин являются маркерами бактериальной или вирусной инфекции в тканях слизистой оболочки. Способствует ли хроническая инфекция слизистой оболочки развитию синдрома постназального затекания, пока неизвестно. Регуляторный протеин NF- $\kappa$ B регулирует гены связанного с воспалением цитокина и медиатора воспаления и аллергическое воспаление [7]. NF- $\kappa$ B может вырабатываться большинством клеток в ответ на различные стимулы, например, инфекцию, радиацию, свободные радикалы и непосредственную травму, а выработка NF- $\kappa$ B вызывает секрецию интерлейкинов и других медиаторов воспаления. Высвобождение человеческого  $\beta$ -дефенсина тесно связано с NF- $\kappa$ B, который является важным триггером выработки  $\beta$ -дефенсина в ответ на бактериальную или вирусную инфекцию [8].

Цель данного исследования — выявление распределения IL и цитокинов в слизистой оболочке носа и носоглотки пациентов с изолированным синдромом постназального затекания.

## Пациенты и методы

Были обследованы две группы пациентов: 1-я группа — 20 пациентов с постназальным затеканием и 2-я (контрольная группа) — из 20 добровольцев. Критериями включения в 1-ю группу были жалобы на постназальное затекание на протяжении более 6 мес и визуальное подтверждение усиленной выработки слизи в носоглотке, но без кашля; отсутствие признаков заболевания придаточных пазух носа по данным компьютерной томографии, исключение аллергии методом инъекционной кожной пробы и определения уровня иммуноглобулина E в крови, а также отсутствие реакции на антирефлюксную терапию (омепразол и диета) (табл. 1). Во 2-ю группу вошли 20 добровольцев, которым проводилась септопластика в связи с искривлением носовой перегородки; основной жалобой этих пациентов было затрудненное дыхание через нос без постназальных выделений (см. табл. 1). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и было утверждено Этическим комитетом Рижского университета им. П. Страдина (№Е-9-2; 02.09.10).

Биопсию проводили под местной или общей анестезией из средней части нижней носовой раковины и средней части свода носоглотки. Кусочки слизистой оболочки (1–2 мм<sup>2</sup>) фиксировали в насыщенном растворе пикриновой кислоты (2% формальдегид; 0,2% пикриновая кислота; 1 М фосфатный буферный раствор, рН 7,2). Иммуногистологические методы использовались для окрашивания структур слизистой оболочки, содержащих PGP 9.5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B и  $\beta$ -дефенсин, как показано выше (табл. 2) [9]. Для оценки образцов слизистой оболочки использовался микроскоп «Leica Microsystems», (Буффало-Грув, Иллинойс, США). Для градации результатов иммуногистохимических исследований использовался полуколичественный метод (табл. 3).

Таблица 1. Характеристика пациентов с синдромом постназального затекания и пациентов из контрольной группы

Характеристика	Синдром постназального затекания (n=20)	Контроль (n=20)
Возраст, годы	25–64	18–51
Пол (женщина/мужчина)	15/5	6/14
Продолжительность наличия симптомов, мес	6–24	0
Предыдущая терапия (безуспешная)	Лоратадин (15 пациентов) Флутиказон (20 пациентов) Омепразол (20–40 мг, два раза в день) (13 пациентов)	—
Локализация биопсии	(1) средняя часть нижней носовой раковины (2) центральная часть области свода носоглотки	(1) средняя часть нижней носовой раковины (2) центральная часть области свода носоглотки

Таблица 2. Антитела, используемые для иммуногистохимического исследования\*

Антитело	Объект	Рабочее разведение	Производитель
Белковый продукт гена 9,5	Кролик	1:600	«Dako», Глоstrup, Дания
Интерлейкин-6	Мышь	1:100	«Santa Cruz Biotechnology», Даллас, Техас, США
Интерлейкин-10	Кролик	1:400	«Abcam», Кембридж, Великобритания
Фактор некроза опухоли $\alpha$	Мышь	1:100	«R&D Systems», Миннеаполис, Миннесота, США

Примечание. \* — адаптация S. Hsu и соавт. [9].

Таблица 3. Обозначение результатов иммуногистохимических исследований

Обозначение	Количество позитивных структур, наблюдаемых в полях зрения
(—)	Нет
(0/+)	Редко
(+)	Мало
(+/++)	Мало/умеренно
(++)	Умеренно
(++/+++)	Умеренно/много
(+++)	Много
(+++/++++)	Очень много

Анализ данных выполнялся на программном обеспечении Statistica, версия 11 (программное обеспечение «Dell», США). Результаты были проанализированы непараметрическими статистическими методами, в том числе с помощью критерия Крускала—Уоллиса и ранговой корреляции Спирмена. Статистическая значимость определялась при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В образцах слизистой оболочки пациентов с синдромом постназального затекания были обнаружены многочисленные нервные волокна, содержащие PGP 9.5 (+++), которые располагались преимущественно рядом со склерозированными артериолами *lamina propria* и железами подслизистого слоя. В образцах слизистой оболочки пациентов из контрольной группы, наоборот, наблюдалось умеренное количество (++) PGP 9.5 в нервных волокнах, преимущественно вокруг кровеносных сосудов и слизистых желез (табл. 4). Существенные различия в распределении цитокинов наблюдались между образцами слизистой оболочки пациентов с синдромом постназального затекания и образцами из контрольной группы. Распределение IL-6 и IL-10 у пациентов 1-й и 2-й групп также значительно отличалось. В 1-й группе было умеренное или большое количество (++/+++) структур, содержащих IL-6 и IL-10, а в образцах слизистой оболочки 2-й группы наблюдались лишь несколько (0/+) IL-6- и IL-10 иммунопозитивных структур (см. табл. 4).

NF-κB в умеренном количестве (++) наблюдался в слизистой оболочке носа и носоглотки пациентов 1-й группы, а в образцах слизистой оболочки носа и носоглот-

ки 2-й группы наблюдались лишь редкие (0/+) NF-κB-иммунопозитивные структуры.

Содержание TNF-α в образцах слизистой оболочки двух групп было схожим. В образцах слизистой оболочки носа и носоглотки пациентов 1-й группы с постназальным затеканием было лишь несколько (+) содержащих TNF-α структур. В слизистой оболочке пациентов 2-й (контрольной) группы были найдены единичные (0/+) структуры, содержащие TNF-α.

Однако по β-дефенсину в образцах слизистой оболочки носа и носоглотки между группами были обнаружены статистически значимые различия. В 1-й группе было умеренное количество (++) β-дефенсина, а в образцах 2-й группы были отмечены лишь редкие (0/+) содержащие β-дефенсин структуры (см. табл. 4).

В результате исследования было установлено, что у пациентов с постназальным затеканием в образцах слизистой оболочки было много нервных волокон, содержащих PGP 9.5, а в контрольной группе их было умеренное количество. В предыдущем исследовании [4] PGP 9.5-иммунопозитивных структур в трех группах пациентов (аллергический ринит, неаллергический ринит и здоровые добровольцы) наблюдалась повышенная иннервация PGP 9.5 слизистой оболочки у пациентов с аллергическим и неаллергическим ринитом по сравнению со здоровыми. На основании предыдущего исследования и полученных результатов мы предполагаем, что PGP 9.5 является маркером повышенной иннервации и воспаления тканей, и его уровень при хронических процессах повышается.

Настоящее исследование показало статистически значимые различия в распределении IL-6 в слизистой оболочке носа и носоглотки обеих групп. Функция IL-6 в воспалительных реакциях изучена не полностью. IL-6 высвобождается в поздней фазе аллергической реакции, включая астму, а также участвует в инфекционном и хроническом воспалении [10]. В соответствии с этим полученные результаты дают основание полагать, что IL-6 обладает двойной функцией — является триггером и модулятором воспаления.

В предыдущем исследовании добавление экзогенного IL-10 в слизистую оболочку носа мышью привело к снижению инфильтрации эозинофилов и тучных клеток и уменьшило реакции Th2 и Th17, но выработка эндогенного IL-10 также снизилась. Эти данные показали значение IL-10 в модулировании воспалительной реакции. В настоящем исследовании статистически значимые различия в

Таблица 4. Статистически значимые результаты исследования слизистой оболочки носа и носоглотки

Фактор	Место	Постназальное затекание (n=20)	Контроль (n=20)	p*
Белковый продукт гена 9,5	Нос	++/+++++	++	0,0001
	Носоглотка	+++ /++++	++	0,0001
Интерлейкин-6	Нос	++/+++	0/+	0,0001
	Носоглотка	+++	0/+	0,0001
Интерлейкин-10	Нос	++/+++	+	0,0001
	Носоглотка	++/+++	+	0,0001
Нуклеарный фактор κB	Нос	+ /++	0/+	0,0002
	Носоглотка	++	0/+	0,0001
β-дефенсин	Нос	++	0/+	0,002
	Носоглотка	++	0/+	0,0001

Примечание. \* — критерий Крускала—Уоллиса.

содержащих IL-10 структурах в группе с постназальным затеканием и контрольной группе дают основание полагать, что воспаление является выраженным в тканях носа и носоглотки пациентов с постназальным затеканием.

Мы не наблюдали статистически значимых различий в распределении TNF- $\alpha$  между двумя группами. TNF- $\alpha$  выделяется при остром воспалении, вызванном бактериальной инфекцией или аллергией. Он стимулирует миграцию нейтрофилов и повышает активность макрофагов, но основное физиологическое действие TNF- $\alpha$  заключается в системных воспалительных реакциях, например лихорадке, повышенном уровне C-реактивного белка и повышенной резистентности к инсулину [6]. Так как значимых различий в TNF- $\alpha$  у пациентов с постназальным затеканием и в контрольной группе не было, возможная роль аллергии в развитии синдрома постназального затекания маловероятна. Этим можно объяснить и отсутствие системных симптомов у пациентов с синдромом постназального затекания.

NF- $\kappa$ B в основном наблюдался в слизистой оболочке носоглотки пациентов с постназальным затеканием. Есть основание полагать, что его действие может быть связано с бактериальной или вирусной инфекцией в носоглотке пациентов с постназальным затеканием и реальным местом патологических изменений может быть слизистая оболочка носоглотки. В наших предыдущих статьях мы сообщали, что у пациентов с синдромом постназального затекания было больше заметных воспалительных изменений, маркеров апоптоза и ремодуляции тканей в слизи-

стой оболочке носоглотки по сравнению со слизистой оболочкой носа [11, 12]. Подобно TNF- $\alpha$ , распределение NF- $\kappa$ B в слизистой оболочке носоглотки важно при персистирующей инфекции, например носоглоточной колонизации *Streptococcus pneumoniae* или репликации респираторно-синцитиального вируса в тканях слизистой оболочки носоглотки [7].

Выявлены статистически значимые различия в распределении  $\beta$ -дефенсина у пациентов с постназальным затеканием и в контрольной группе.  $\beta$ -дефенсин человека — это противомикробный пептид, его вырабатывают эпителиальные клетки дыхательных путей и слизистой оболочки пищеварительного тракта. Другие исследования подтвердили, что  $\beta$ -дефенсин может активировать незрелые дендритные клетки [8]. Полученные результаты, наряду с данными по NF- $\kappa$ B, совпадают с гипотезой о значении бактериально-вирусной инфекции в развитии изолированного синдрома постназального затекания.

## Заключение

В целом в тканях слизистой оболочки носа и носоглотки пациентов с синдромом постназального затекания наблюдается повышение PGP 9.5, IL-6, IL-10, NF- $\kappa$ B и  $\beta$ -дефенсина. Это дает основание полагать, что при данном заболевании может происходить выраженная активация всех факторов локальной иммунной системы.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sanu A, Eccles R: Postnasal drip syndrome. Two hundred years of controversy between UK and USA. *Rhinology*. 2008;46:86-91.
2. Sylvester DC, Karkos PD, Vaughan C, Johnston J, Dwivedi RC, Atkinson H, Korteque S. Chronic cough, reflux, postnasal drip syndrome, and the otolaryngologist. *Int J Otolaryngol*. 2012;564852. <https://doi.org/10.1155/2012/564852>
3. Artico M, Bosco S, Bronzetti E, Felici LM, Pelusi G, Lo Vasco VR, Vitale M. Peribronchial innervation of the rat lung. *Int J Mol Med*. 2004;14:615-620. <https://doi.org/10.3892/ijmm.14.4.615>
4. Sin B, Togias A. Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. *Proc Am Thorac Soc*. 2011;8:106-114. <https://doi.org/10.1513/pats.201008-057RN>
5. Fang SY, Shen CL. Neuropeptide innervation and neuroendocrine cells in allergic rhinitis and chronic hypertrophic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 1998;28:228-232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00204.x>
6. Mo JH, Kang EK, Quan SH, Rhee CS, Lee CH, Kim DY. Antitumor necrosis factor-alpha treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy*. 2011;66:279-286. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02476.x>
7. Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF- $\kappa$ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res*. 2010;20:24-33. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.137>
8. Pacova H, Astl J, Martinek J. The pathogenesis of chronic inflammation and malignant transformation in the human upper airways: the role of beta-defensins, eNOS, cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol*. 2009;24:815-820. <https://doi.org/10.14670/HH-24.815>
9. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:577-580. <https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>
10. Zhu Z, Tang W, Ray A, Wu Y, Einarsson O, Landry ML, Gwaltney J Jr, Elias JA. Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro. Evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation. *J Clin Invest*. 1996;97:421-430. <https://doi.org/10.1172/JCI118431>
11. Sumeraga G, Pilmane M, Kise L. Tissue remodeling process in upper airway mucosa in case of isolated post nasal drip syndrome. *Medicinos Teorija ir Praktika*. 2012;18:260-266.
12. Sumeraga G, Pilmane M. Distribution of neuropeptides in nasal and nasopharyngeal mucosa in patients with the post nasal drip syndrome. *Papers on Anthropology*. 2011;20:389-404. <https://doi.org/10.12697/poa.2011.20.36>

Поступила 28.07.17