

## بررسی سوپرانتی‌ژن‌ها در بافت پولیپ بیماران مبتلا به رینوسینوزیت مزمن در مقایسه با گروه کنترل: گزارش کوتاه

### چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۲۲

**زمینه و هدف:** استافیلوکوک اورئوس سوپرانتی‌ژن‌های زیادی ترشح می‌کند که در التهاب مخاط سینوس‌ها و ایجاد رینوسینوزیت مزمن نقش دارند. هدف این مطالعه، بررسی وجود این سوپرانتی‌ژن‌ها در بافت پولیپ بینی مبتلایان به رینوسینوزیت مزمن و مقایسه آن با گروه کنترل بود.

**روش بررسی:** آنالیز بافت پولیپ بینی در ۳۸ بیمار و نمونه مخاطی ۱۴ کنترل از نظر وجود سوپرانتی‌ژن‌های اگزوتوکسین A، B، C، D و TSST1 با روش RT-PCR و ELISA انجام شد.

**یافته‌ها:** در بررسی RT-PCR در ۸۸/۲٪ بیماران و ۴۵/۵٪ گروه کنترل حداقل یک سوپرانتی‌ژن شناسایی شد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارد ( $P=0/03$ ). در بررسی کلی از نظر سوپرانتی‌ژن‌ها با روش ELISA در ۱۰۰٪ بیماران و ۳۵/۵٪ گروه کنترل حداقل یک سوپرانتی‌ژن شناسایی شد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت ( $P<0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** نشان داده شد که بین سوپرانتی‌ژن‌های استافیلوکوکی و پولیپ بینی و احتمال دخالت آن‌ها با پاتوژن پولیپوز بینی ارتباط وجود دارد.

**کلمات کلیدی:** سوپرانتی‌ژن، RT-PCR، ELISA.

محمد فرهادی<sup>۱</sup>، آذردخت طباطبایی<sup>۲\*</sup>، مهدی شکرآبی<sup>۳</sup>، ثمینه نوربخش<sup>۴</sup>، شیما جوادی‌نیا<sup>۵</sup>، یاسر قوامی<sup>۶</sup>

۱- گروه گوش و حلق و بینی، مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی و سر و گردن، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، ۲- کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات عفونی کودکان، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) ۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی ۴- گروه عفونی اطفال، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) ۵- رزیانت داخلی، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، ۶- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)

دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، مجتمع آموزشی رسول اکرم (ص)، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی کودکان

تلفن: ۰۲۱-۶۶۵۱۶۰۴۹  
E-mail: cpidir@gmail.com

### مقدمه

پولیپ است.<sup>۶</sup> سایتوکین‌های التهابی در فراخوانی لنفوسیت‌ها و افزایش بیان مولکول‌های چسبان در این بیماری حایز اهمیت می‌باشند. محققین اعتقاد دارند که سوپرانتی‌ژن‌ها در فراخوانی و فعالیت لنفوسیت‌های تجمع‌یافته نقش دارد.<sup>۷،۸</sup>

### روش بررسی

بیماران مراجعه‌کننده به درمانگاه ENT، پس از معاینه و انجام آزمایشات کلینیکی با تشخیص پولیپ در بخش بستری شده و پیش از عمل برداشتن پولیپ از بیماران پرسش‌نامه تهیه می‌شود. بافت پولیپ توسط جراح برداشته و در سرم فیزیولوژی در  $4^{\circ}\text{C}$  -۸۶

پولیپ بینی (Nasal polyp) یک توده خوش‌خیم از مخاط بینی یا سینوس‌هاست که در ۴-۱٪ افراد دیده می‌شود. پولیپ بینی در بیماری سیستمیک فیبروزیس، آسم و افزایش حساسیت به آسپیرین دیده می‌شود، ولی علت آن مشخص نیست.<sup>۱-۳</sup> عوامل ایجاد پولیپ بینی شامل عفونت‌ها، التهاب یا به هم خوردن موازنه مسیرهای متابولیک و یک‌سری مسایل ایمونولوژیک (و نه لزوماً آلرژی) می‌باشند.<sup>۴،۵</sup> پولیپ بینی بیماری مزمن مجاری تنفسی فوقانی است که بیش‌تر با سینوزیت مزمن همراه است و افزایش توده‌های مخاطی در این بیماران در پی آسیب اولیه مخاطی و تجمع لنفوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها در بافت

و از شاخص‌های پراکندگی (طیف و انحراف معیار) استفاده شده است. جهت تحلیل داده‌ها، برای مقایسه متغیرهای کیفی، از آزمون  $\chi^2$  استفاده شد.

### یافته‌ها

۱۹ فرد کنترل و ۲۸ بیمار مبتلا به رینوسینوزیت مزمن با پولیپ در این مطالعه بررسی شدند. متوسط سن بیماران ۳۶/۴ (انحراف معیار ۱۲/۸) و افراد سالم ۳۹/۹ (انحراف معیار ۱۷/۱) بود. در گروه بیماران ۱۷ نفر (۶۱ درصد) و در گروه کنترل هشت نفر (۴۲ درصد) مذکر بودند.

سابقه آلرژی و پولیپ در گروه بیماران به ترتیب ۶۵٪ و ۵۲٪ و در گروه افراد کنترل به ترتیب ۳۹٪ و ۳۷٪ بود. نتایج بررسی سوپرآنتی‌ژن‌ها با آزمایش نمونه بافت توسط روش PCR در گروه بیماران و گروه کنترل در جدول ۱ آمده است. همچنین نتایج بررسی سوپرآنتی‌ژن‌ها با آزمایش نمونه بافت توسط روش ELISA در این دو گروه در جدول ۲ ذکر شده است.

نگه‌داری می‌شود. بعد از هم‌وزنیزه کردن نمونه‌ها، میزان آگزوتوکسین‌ها با روش الایزا و ژن‌های بیان‌کننده آگزوتوکسین‌ها با روش RT-PCR بررسی می‌شوند. جهت گروه کنترل از ترشحات موکوس سینوسی افراد مبتلا به رینوسینوزیت مزمن استفاده می‌شود.

استخراج RNA و انجام RT-PCR: ابتدا پنج تا ۱۰ میلی‌گرم از بافت وزن شده و سپس RNA با استفاده از کیت استخراج (Roche Co., Germany) جدا می‌شود. RNA مربوطه تا زمان انجام تست مراحل بعدی در حرارت ۷۰- نگه‌داری می‌شود. سپس به میزان ۵-۰/۱ میکروگرم RNA، یک میکرولیتر از پرایمر الگو اضافه شده و به آن آب دیونیزه، بافر واکنش‌دهنده، ممانعت‌کننده، dNTP و آنزیم M-MULV اضافه می‌شود. سپس با انجام زمان‌های انکوباسیون لازمه، cDNA تهیه و برای انجام PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

انجام تست الایزا: مقدار معینی بافت را وزن کرده و با بافر PBS (PH:۷/۴) به وسیله دستگاه Ultra-Turrax T25 ساخت آلمان هم‌وزن می‌شود. سپس از نمونه هم‌وزن، میزان توکسین‌ها با استفاده از کیت الایزا مورد سنجش قرار گرفت. جهت گزارش توصیفی داده‌ها از شاخص‌های فراوانی نسبی، میانگین، میانه

جدول- ۱: درصد بیان ژن‌های سوپرآنتی‌ژن‌های استافیلوکوک در بافت پولیپ بیماران و مقایسه با بافت مخاط بینی گروه کنترل

تمام سوپرآنتی‌ژن‌ها	TSST1	آگزوتوکسین D	آگزوتوکسین C	آگزوتوکسین B	آگزوتوکسین A	بیمار
۸۸/۲٪	۶۲/۵۰٪	۰	۷۶/۵۰٪	۵۰٪	۵۶/۳۰٪	بیمار
۴۵/۵٪	۹/۱۰٪	۰	۳۶/۴۰٪	۰	۴۳/۸۰٪	کنترل
۰/۰۳	۰/۰۰۸	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۲۴		P*

\* آزمون آماری:  $\chi^2$  و مقادیر  $P < 0/05$  با ارزش تلقی گردید. توکسین سندرم شوک توکسیک نوع ۱ = TSST1

جدول- ۲: درصد وجود سوپرآنتی‌ژن در بافت پولیپ بیماران و مقایسه با گروه کنترل

تمام سوپرآنتی‌ژن‌ها	TSST1	آگزوتوکسین D	آگزوتوکسین C	آگزوتوکسین B	آگزوتوکسین A	بیمار
۱۰۰٪	۵۹/۳٪	۲۰/۸٪	۵۵/۶٪	۶۰/۷٪	۴۲/۹٪	بیمار
۳۵/۳٪	۱۲/۵٪	۵/۹٪	۲۳/۵٪	۵/۹٪	۲۳/۵٪	کنترل
۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۳۷	۰/۰۴	۰/۰۰۱	۰/۱۹	P*

\* آزمون آماری:  $\chi^2$  و مقادیر  $P < 0/05$  با ارزش تلقی گردید. توکسین سندرم شوک توکسیک نوع ۱ = TSST1

## بحث

IFN- $\gamma$ ، IL-10 و TGF- $\beta$  خواهد شد. بنابراین دور از انتظار نخواهد بود که انتشار ائوزینوفیل‌ها و افزایش سنتز IgE نیز در مخاط‌ها بافت پولیپ ملاحظه گردد که مجدداً تئوری ارتباط متقابل ترشح سایتوکین‌های التهابی با زمینه آلرژی در بروز پولیپ به گونه دیگری اثبات می‌گردد.<sup>۱۳</sup>

Van Zele نشان داد که سنتز موضعی آنتی‌بادی IgE، IgA و IgG در بافت همورنه شده، پولیپ به‌طور قابل توجهی افزایش داشته و IgE ضد انتروتوکسینی یا استافیلوکوکی نیز افزایش می‌یابد، در حالی که این تغییرات در سرم بیماران اثبات نگردیده است که این یافته نیز تغییرات سلولی TH2 که سلول موثر برای تولید IL-6 و IL-5 و در نهایت سنتز IgE در بافت می‌باشد را نیز به اثبات می‌رساند. بنابراین سوپراآنتی‌ژن‌ها را می‌توان به‌عنوان یکی از عوامل القاکننده واکنش التهابی آبشاری که منتهی به سینوزیت هیپرپلاستیک و تشکیل توده‌های پولیپی گردد معرفی نمود.<sup>۱۴</sup> واکنش‌های التهابی و فراخوانی لکوسیتی و عملکرد سوپراآنتی‌ژن‌ها پدیده‌ای موضعی در بافت است. عدم افزایش ابراز ژن انتروتوکسین D و عدم افزایش غلظت آن در بافت نیاز به مطالعات بیش تری دارد.

فرضیه سوپراآنتی‌ژنی چنین بیان می‌شود که آگزوتوکسین‌های استافیلوکوک موجب فراخوانی لکوسیت‌های بافتی شده و در نهایت با ترشح کموکاین‌های مختلف موجب جلب ائوزینوفیل‌ها، سلول‌های TH و لنفوسیت‌های B خواهد شد. چنانچه در بافت پولیپ تولید IgE اختصاصی بر علیه توکسین‌های استافیلوکوک و انتشار سلول‌های T با توالی خاصی از V $\beta$  اثبات گردیده است.

در مطالعه Bernstae در مخاط بینی افراد مستعد به پولیپ در ۷۵٪ موارد استافیلوکوک طلائی جدا شده در حالی که شیوع کلونیزاسیون این باکتری در جمعیت سالم حدود ۲۵٪ است. غالب استافیلوکوک‌های جدا شده در بیماران در شرایط آزمایشگاهی تولید سوپراآنتی‌ژن می‌نمایند. بنابراین مطالعه اخیر یک‌بار دیگر شواهد قوی تری برای ارتباط سوپراآنتی‌ژن‌های استافیلوکوکی با بروز پولیپ و یا تشدید التهاب ناشی که در نهایت منجر به پرولیفراسیون مخاط بینی را ارائه می‌دهد.<sup>۹</sup>

سپاسگزاری: این مقاله حاصل تلاش همکاران در مرکز تحقیقات گوش، حلق و بینی و سر و گردن و مرکز تحقیقات عفونی کودکان در مجتمع آموزشی رسول اکرم (ص) می‌باشد.

سوپراآنتی‌ژن‌ها پروتیین‌های مشتق شده از بسیاری از باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها هستند که بعد از آزادسازی قادرند حتی تا ۳۰٪ کلون‌های لنفوسیتی را در بدن فعال سازند و با اتصال متقابل قطعات غیرپلی مورفیک HLA و زنجیره TCR- $\beta$  لنفوسیت‌ها را به‌طور غیراختصاصی فعال نموده و با ترشح آبشاری سایتوکین‌ها، التهاب ژنرالیزه در بدن ایجاد می‌نمایند. نشان داده شده است سوپراآنتی‌ژن‌های استافیلوکوکی به‌طور ویژه موجب افزایش ترشح TNF- $\alpha$  و اینترلوکین چهار و پنج می‌شود. استافیلوکوک طلائی مکرراً از مجاری تنفسی فوقانی بیماران مبتلا به رینوسینوزیت و مبتلا به پولیپوز جدا شده و حدوداً ۵۰ تا ۶۰٪ این باکتری‌ها سم‌زا هستند.<sup>۹،۱۰</sup>

در مطالعه‌ی اخیر، ارتباط بسیار قوی بین بروز پولیپ در زمینه رینوسینوزیت مشاهده گردید که با مطالعات Bernstein, Bachert, Wang هم‌خوانی دارد.<sup>۱۱،۱۲</sup>

Wang نشان داد علاوه بر این که انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و TSST-1 در بافت پولیپ افزایش دارند، درصد لنفوسیت‌های T V $\beta$  در بافت پولیپ در مواردی که آزمایش الیزا برای سوپراآنتی‌ژن‌ها در فراخوانی لنفوسیت‌های T در بافت پولیپ نقش موثر داشته باشند و به‌طور غیرمستقیم فرضیه دخالت سوپراآنتی‌ژن‌ها در پاتوژنز پولیپ را اثبات می‌نماید که در تحقیق اخیر نیز افزایش ابراز ژن سوپراآنتی‌ژن‌های A, B, C و TSST-1 در بافت پولیپ اثبات گردیده و غلظت سوپراآنتی‌ژن‌های مذکور نیز در بافت پولیپ در مقایسه با بافت مخاطی افزایش نشان می‌دهد. در روش RT-PCR در بافت RNA انتروتوکسین D قابل تفکیک نبوده و میزان این توکسین در بافت نیز قابل تشخیص نبود.<sup>۱۲</sup>

در مطالعه قبلی Farhadi ابراز سایتوکین‌های تیپ دو در القای واکنش پولیپی اثبات شده است.<sup>۱۳</sup>

یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که سوپراآنتی‌ژن‌های آزاد شده علاوه بر تخریب اولیه بافتی موجب ترغیب گرایش سایتوکینی از TH2 به TH1 در سلول‌های منتشر شده در بافت شده و چون سلول‌های T به‌صورت پلی‌کلونال فعال گردیده و بنابراین تجمع سلول‌های TH2 در بافت پولیپ موجب افزایش ترشح IL-2، IL-5، IL-4 و کاهش ترشح

## References

- Zhang N, Holtappels G, Claeys C, Huang G, van Cauwenberge P, Bachert C. Pattern of inflammation and impact of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyps from southern China. *Am J Rhinol* 2006;20(4):445-50.
- Franco LP, Camargos PA, Becker HM, Guimarães RE. Nasal endoscopic evaluation of children and adolescents with cystic fibrosis. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009;75(6):806-13.
- Suh YJ, Yoon SH, Sampson AP, Kim HJ, Kim SH, Nahm DH, et al. Specific immunoglobulin E for staphylococcal enterotoxins in nasal polyps from patients with aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34(8):1270-5.
- Van Cauwenberge P, Van Zele T, Bachert C. Chronic rhinosinusitis and nasal polyposis: the etiopathogenesis revealed? *Verh K Acad Geneesk Belg* 2008;70(5-6):305-22.
- Takeo S, Hirakawa K, Ueda T, Furukido K, Osada R, Yajin K. Nuclear factor-kappa B activation in the nasal polyp epithelium: relationship to local cytokine gene expression. *Laryngoscope* 2002;112(1):53-8.
- Deutsch E, Kaufman M, Nisman B, Barak V. Cytokine evaluation in throat infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107(8):713-6.
- Lee CH, Rhee CS, Min YG. Cytokine gene expression in nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107(8):665-70.
- Bachert C, van Zele T, Gevaert P, De Schrijver L, Van Cauwenberge P. Superantigens and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003;3(6):523-31.
- Bernstein JM, Kansal R. Superantigen hypothesis for the early development of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13(1):39-44.
- Bernstein JM, Ballou M, Schlievert PM, Rich G, Allen C, Dryja D. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Am J Rhinol* 2003;17(6):321-6. Erratum in: *Am J Rhinol* 2004;18(1):62.
- Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(1):34-8.
- Wang M, Shi P, Chen B, Zhang H, Jian J, Chen X, et al. The role of superantigens in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008;70(2):97-103.
- Farhadi M, Tabatabaee A, Shekarabi M, Noorbaksh S, Khatib M, Javadinia Sh. The comparison of TH1 and TH2 cytokines gene expression in allergic and non-allergic patients with nasal polyps by PCR. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2011;69(9):576-80.
- Van Zele T, Vanechoutte M, Holtappels G, Gevaert P, van Cauwenberge P, Bachert C. Detection of enterotoxin DNA in *Staphylococcus aureus* strains obtained from the middle meatus in controls and nasal polyp patients. *Am J Rhinol* 2008;22(3):223-7.

## Superantigens in polyp tissue of patients with chronic rhino-sinusitis, a comparative study: a brief report

Mohammad Farhadi M.D.<sup>1</sup>  
Azardokht Tabatabaee M.Sc.<sup>2\*</sup>  
Mehdi Shekarabi Ph.D.<sup>3</sup>  
Samileh Noorbakhsh M.D.<sup>4</sup>  
Shima Javadi Nia M.D.<sup>5</sup>  
Yaser Ghavami M.D.<sup>6</sup>

1- Department of ENT Research Center, Hazrat-e-Rasoul Akram Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- M.Sc. in Laboratory Science, Instructor and Faculty member, Research Institute for Pediatric Infectious Diseases, Hazrat-e-Rasoul Akram Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

4- Department of Pediatric Infectious Disease, Research Institute for Pediatric Infectious Diseases, Hazrat-e-Rasoul Akram Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5- Internal Medicine Resident, Hazrat-e-Rasoul Akram Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

6- General Practitioner, ENT Research Center, Hazrat-e-Rasoul Akram Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding author: Niayesh St., Sattarkhan St., Hazrat-e-Rasoul Training Medical Complex, Tehran, Iran.  
Tel: +98-21-66516049  
E-mail: cpidir@gmail.com

### Abstract

Received: January 11, 2012 Accepted: June 11, 2012

**Background:** *Staphylococcus aureus* secretes numerous superantigens which trigger the inflammatory mechanisms of sinus mucosa and cause chronic rhino-sinusitis. This study was designed to evaluate the role of *staphylococcus aureus* superantigens in polyp tissues of patients with chronic rhino-sinusitis in comparison with a control group.

**Methods:** Polyp tissue samples of 28 patients and mucosal specimens of 19 healthy individuals were evaluated for *staphylococcus aureus* bacterium superantigens, exotoxins A, B, C and D and TSST-1 with RT-PCR and ELISA methods Rasoul Akram Hospital during 2 years.

**Results:** Polymerase chain reaction (PCR) results revealed that 88.2% of the patients and 45.5% of the controls had at least one type of superantigen (P=0.03). Evaluation of superantigens using ELISA method showed presence of at least one type of superantigen in the nasal samples of all patients and in 35.3% of the controls (P<0.001).

**Conclusion:** A relationship between staphylococcal superantigens and nasal polyps is concluded from this study which indicates the probable role of these superantigens in the pathogenesis of nasal polyposis.

**Keywords:** ELISA, RT-PCR, superantigens.