

Персонализированная иммунотерапия в лечении гипертрофии аденоидных вегетаций у детей

Л.В.Ковальчук¹, Л.В.Ганковская¹, И.В.Рахманова¹, О.А.Свитич^{1,2}, Г.М.Зинкер³,
В.А.Ганковский¹, Д.Д.Карташов¹, Ю.В.Волкова¹, К.В.Руссанова¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва (и.о. ректора — проф. А.Г.Камкин);

²НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН, Москва (директор — акад. РАМН, проф. В.В.Зверев);

³Морозовская детская городская клиническая больница (главный врач — проф. И.Е.Колтунов)

Представлены результаты изучения эффективности персонализированной иммунотерапии у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций II–III степени. Установлено, что применение аутологичного комплекса иммунопептидов, включающего цитокины и противомикробные пептиды, вырабатываемые лейкоцитами пациента, приводило к нормализации носового дыхания, снижению частоты развития отитов и ОРВИ в течение 6 мес наблюдения после лечения. Выявлены индивидуальные различия в экспрессии генов молекул врожденного иммунитета в слизистой оболочке полости носа, что дает основание для персонализированного подхода к иммунотерапии.

Ключевые слова: персонализированная иммунотерапия, врожденный иммунитет, гипертрофия аденоидных вегетаций, цитокины, противомикробные пептиды

Personalized immunotherapy in the treatment of hypertrophy of adenoid vegetation in children

L.V.Kovalchuk¹, L.V.Gankovskaya¹, I.V.Rakhmanova¹, O.A.Svitich^{1,2}, G.M.Zinker³,
V.A.Gankovskiy¹, D.D.Kartashov¹, Yu.V.Volkova¹, K.V.Russanova¹

¹The Russian National Research Medical University named after N.I.Pirogov, Moscow (Acting Rector — Prof. A.G.Kamkin);

²I.I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, RAMS, Moscow (Director — Acad. of RAMS, Prof. V.V.Zverev);

³Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Moscow (Chief Doctor — Prof. I.E.Koltunov)

The results of the study of the effectiveness of personalized immunotherapy in children with hypertrophy of II–III degree adenoid vegetations are presented in the article. It was established, that application of autologous complex of immunopeptides including cytokines and antimicrobial peptides produced by white blood cells of the patients, led to the normalization of nasal breathing, a reduction in the frequency of otitis and of respiratory viral infections at 6 months observation after the treatment. There were identified individual differences in gene expression of molecules of the innate immunity in the mucosa of the nasal cavity, what provides the personalized approach to immunotherapy.

Key words: personalized immunotherapy, innate immunity, hypertrophy of adenoid vegetation, cytokines, antimicrobial peptides

В связи с расшифровкой генома человека, развитием молекулярно-генетических технологий в современной медицине сформировалось новое направление — персонализированная медицина, кото-

Для корреспонденции:

Ганковская Людмила Викторовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической иммунологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова, руководитель НКЦ персонализированной медицины Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-9000
E-mail: lgan@yandex.ru

Статья поступила 17.04.2012 г., принята к печати 05.06.2012 г.

рое подразумевает персонализированный подход к диагностике и лечению пациента на основе молекулярно-генетических особенностей организма.

На кафедре иммунологии ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова разработана оригинальная медицинская технология, основанная на получении пептидов иммунной системы пациента и применении их в качестве лечебного средства. Данный метод получил название персонифицированной иммунотерапии и разрешен к применению. Суть его заключается в локальном применении аутологичного комплекса важных регуляторных молекул — цитокинов и противомикробных пептидов, полученных при культивиро-

вании лейкоцитов пациента [1]. Клинические исследования показали высокую эффективность метода в лечении заболеваний, сопровождающихся воспалением, инфекцией, нарушением иммунных механизмов защиты [2, 3].

Во всем мире за последние десятилетия наблюдается тенденция к увеличению частоты встречаемости гипертрофии аденоидных вегетаций у детей [4]. Гипертрофированная лимфоидная ткань носоглотки может быть причиной развития патологических изменений как местного характера (риниты, синуситы, отиты), так и системного характера (нарушение обмена веществ, иммунных механизмов, гипоксия, апноэ, энурез и др.) [5]. Принимая во внимание тот факт, что в лимфоидной ткани носоглотки формируется мукозальный иммунитет ЛОР-органов, большое внимание уделяется разработке и внедрению методов с применением иммуностропных препаратов — иммунотерапии.

В связи с этим целью настоящего исследования стала разработка алгоритма персонализированной иммунотерапии детей с гипертрофией аденоидных вегетаций.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить исходный уровень показателей врожденного иммунитета (экспрессию генов TLR2, TLR4, TLR9, HBD-2, α -дефензинов) в слизистой оболочке полости носа здоровых детей и детей с аденоидными вегетациями.
2. Получить аутологичный комплекс иммунопептидов и оценить в нем содержание цитокинов и противомикробных пептидов.
3. Оценить клиническую эффективность применения персонализированной иммунотерапии.

Пациенты и методы

На базе кафедры оториноларингологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И.Пирогова (зав. кафедрой — чл.-кор. РАМН, проф. М.Р.Богомильский) и консультативной поликлиники ГБКЗД «Морозовская детская городская клиническая больница» (зав. поликлиникой — к.м.н. Г.М.Зинкер) были обследованы 37 детей в возрасте от 4 до 8 лет, из них 24 мальчика и 13 девочек. Всем обследованным детям были проведены тщательный оториноларингологический осмотр (передняя риноскопия, отоскопия, фарингоскопия), рентгенография носоглотки и исследование слуховой функции. Наблюдаемые дети были разделены на три группы. Первую группу (основную) составили 12 детей с диагнозом «гипертрофия аденоидных вегетаций II–III степени». Всем детям первой группы наряду с общепринятым консервативным лечением гипертрофии аденоидных вегетаций назначали персонализированную иммунотерапию. Вторую группу (сравнения) составили 14 детей с диагнозом «гипертрофия аденоидных вегетаций II–III степени». Всем детям группы сравнения проводилось общепринятое консервативное лечение гипертрофии аденоидных вегетаций. Третью группу (контрольную) составили

11 здоровых детей с диагнозом «аденоиды I–II степени». Жалоб на момент осмотра родители и их дети не предъявляли. При оториноларингологическом осмотре патологии не выявлено. В анамнезе у этих детей не было заболеваний острыми средними отитами в течение последних трех месяцев до обследования.

Перед обследованием детей получено информированное согласие родителей на проведение дополнительных исследований.

На базе НКЦ персонализированной медицины РНИМУ им. Н.И.Пирогова проведено исследование врожденного иммунитета в слизистой оболочке полости носа. После предварительной санации полости носа получали клетки слизистой оболочки с помощью специальной щеточки.

На первом этапе из биологического материала выделяли РНК с использованием колоночных технологий — набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Далее методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определяли экспрессию генов TLR2, TLR4, TLR9, HBD-2 и α -дефензинов. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора реактивов для проведения обратной транскрипции» (Синтол, РФ) строго по инструкции фирмы-производителя. Для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени подбирали последовательность праймеров и зондов с помощью программы Vector NTI 8.0, анализируя последовательность генов, полученную из электронной базы данных GenBank. Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Данные представлены в виде отношения десятичного логарифма количества копий исследуемого гена к десятичному логарифму 1 млн копий гена актина [6].

Получение аутологичного комплекса иммунопептидов проводили согласно утвержденной медицинской технологии [1]. После определения концентрации цитокинов и нейтрофильных пептидов HNP-1-3 (Human Neutrophil Peptides) полученный комплекс иммунопептидов закапывали по 2 капли в каждую половину носа 2 раза в день в течение 6 дней. После проведения курса терапии выполняли повторную оценку показателей врожденного иммунитета и исследовали клиническую эффективность (изменение носового дыхания, заболеваемость ОРВИ, острыми средними катаральными отитами) в течение 6 мес после лечения. Программа применения персонализированной иммунотерапии утверждена на заседании Этического комитета РНИМУ им. Н.И.Пирогова (протокол № 103 от 13.12.2010).

Содержание цитокинов (ФНО- α , ТФР- β 1) и нейтрофильных дефензинов HNP-1-3 в аутологичном комплексе определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы Bender MedSystem.

В ходе исследования контролировали динамику изменения носового дыхания, степени гипертрофии

Таблица. **Уровень экспрессии генов молекул врожденного иммунитета у здоровых детей и детей с гипертрофией аденоидных вегетаций**

Обследуемые группы	Уровень экспрессии генов, Ig (количество копий исследуемого гена) / Ig (1 млн копий гена актина)				
	TLR2	TLR4	TLR9	HBD-2	HNP-1
Здоровые дети	2,89 ± 1,05	3,10 ± 0,22	2,64 ± 0,37	3,73 ± 0,63	5,27 ± 0,43
Дети с аденоидными вегетациями	3,12 ± 0,63	4,27 ± 1,52	2,93 ± 0,59	3,94 ± 0,91	6,07 ± 0,37

глоточной миндалины, выявляли особенности заболеваемости в течение 6 мес до лечения и 6 мес после проведения иммунотерапии.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica v.9». Различия между группами оценивали с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни [7].

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования проведена оценка показателей врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций и у здоровых детей.

Определена экспрессия генов рецепторов, распознающих различные патогены, — так называемых Toll-like receptors (TLRs): TLR2, TLR4, TLR9, — и противомикробных пептидов (HBD-2, нейтрофильного пептида HNP-1). Результаты представлены в таблице.

Не выявлено достоверных отличий в показателях врожденного иммунитета у детей обследованных групп ($p > 0,05$). Наблюдалась лишь тенденция увеличения экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 и противомикробных пептидов в слизистой оболочке полости носа под действием микроорганизмов у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций.

При анализе индивидуальных показателей выявлены следующие закономерности:

- экспрессия гена TLR2 была увеличена у 50% детей с гипертрофией аденоидных вегетаций, у 50% детей этот показатель не отличался от показателя группы здоровых детей;

- уровень экспрессии гена TLR4, распознающего липополисахарид грамотрицательных бактерий, был увеличен у всех детей с гипертрофией аденоидных вегетаций;

- экспрессия гена TLR9, распознающего нуклеиновые кислоты бактериального и вирусного происхождения, была снижена у 40% детей с гипертрофией аденоидных вегетаций.

На рис. 1 представлены в качестве примера индивидуальные данные экспрессии генов исследуемых молекул у двух пациентов основной группы.

Согласно медицинской технологии, для каждого пациента основной группы были получены аутологичные комплексы иммунопептидов (АКИ) [1].

В полученных АКИ оценивали содержание провоспалительного цитокина ФНО- α , противовоспалительного цитокина ТФР- β 1, нейтрофильных пептидов (HNP-1–3). Выявлены индивидуальные различия в концентрации иммунопептидов. Средние значения пептидов в АКИ составили: для ФНО- α — $3,9 \pm 2,8$ пг/мл, для ТФР- β 1 — $267,7 \pm 135,8$ пг/мл, для HNP-1–3 — $3500,2 \pm 500,1$ пг/мл.

Спустя 6 мес после иммунотерапии или стандартного лечения проведена оценка клинической эффективности проводимого лечения.

Анализ заболеваемости показал, что исходно, до лечения, в обеих группах наблюдались катаральные острые отиты — у 50% детей основной группы и 42,8% детей группы сравнения. Частота ОРВИ в обеих группах была сопоставима: 41,6% в основной группе и 42,8% в группе сравнения (рис. 2 А, Б).

В течение 6 мес после проведения иммунотерапии отмечено достоверное снижение частоты возникновения катаральных отитов. Только у одного ребенка основной группы был диагностирован катаральный отит (рис. 2 А). Сократилась частота ОРВИ в основной группе детей. За период наблюдения у 4 детей выявлено лишь по одному эпизоду ОРВИ. В группе сравнения выявлены 2–3 эпизода ОРВИ у 5 детей в течение 6 мес.

Затруднение носового дыхания отмечено у 58,3% (7) детей основной группы и у 57,1% детей группы сравнения. После проведенного лечения у детей обеих групп улучшилось носовое дыхание. Более значимое улучшение наблюдалось у детей, которым проводили иммунотерапию АКИ. Лишь у 3 детей (25%) этой группы сохранялось затруднение дыхания через нос.

После применения АКИ было отмечено снижение экспрессии генов молекул врожденного иммунитета у детей с исходно повышенными значениями этих показателей (рис. 1 А). Такое изменение может быть связано с ингибирующим влиянием ТФР- β 1, содержащегося в АКИ, на экспрессию генов TLRs. Согласно исследованиям T.Matsumura, ТФР- β 1 блокирует экспрессию рецептора IL-1R, что, в свою очередь, ведет

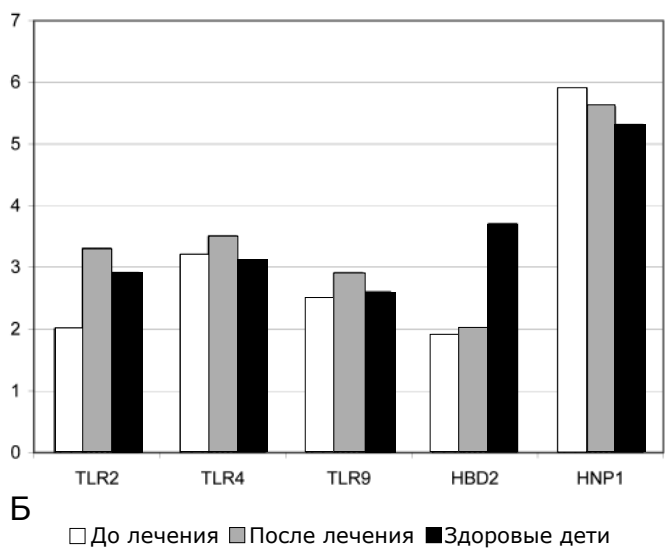
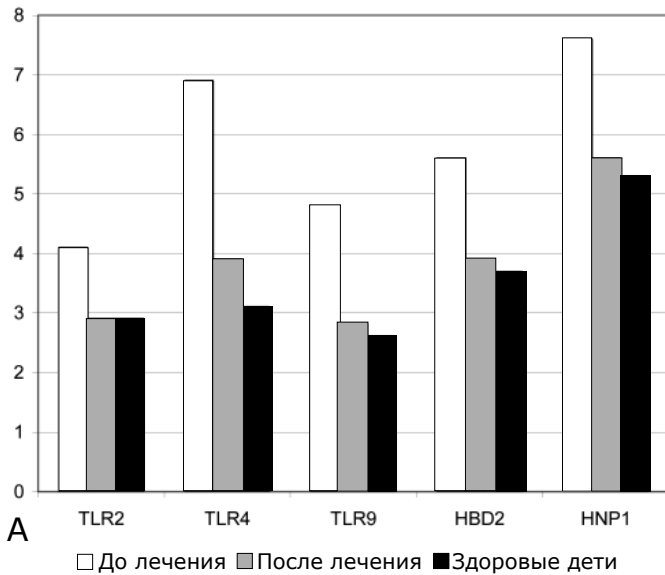


Рис. 1. Индивидуальные показатели экспрессии генов молекул врожденного иммунитета в слизистой оболочке полости носа у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций до и после лечения комплексом аутологических иммунопептидов

А. Показатели пациента с исходно повышенным уровнем экспрессии генов. Б. Показатели пациента с исходно сниженным уровнем экспрессии генов. По оси ординат — отношение десятичного логарифма количества копий гена к десятичному логарифму 1 млн копий гена актина

к снижению продукции ИЛ-1 и вследствие этого — к снижению экспрессии TLR [8]. При нормальном или сниженном уровне экспрессии генов молекул врожденного иммунитета применение АКИ увеличивало экспрессию этих генов (рис. 1 А). Экспрессия гена противомикробного пептида HBD2 снижалась в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$).

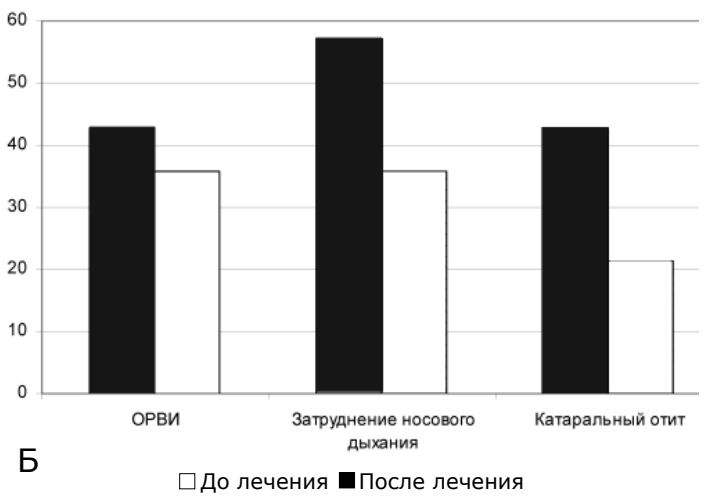
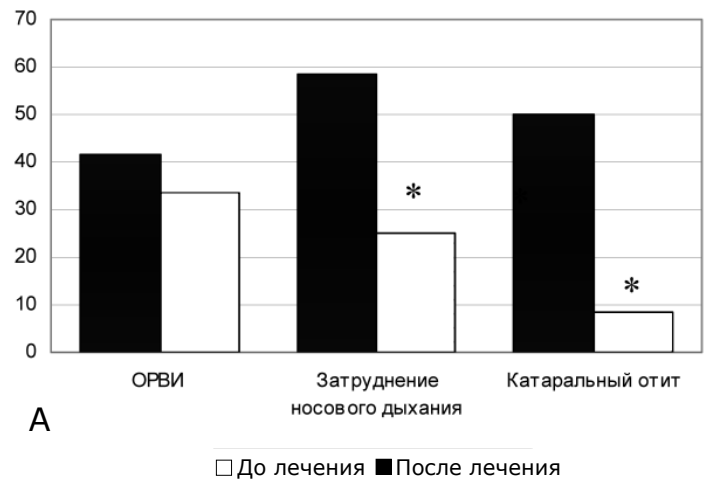


Рис. 2. Частота развития осложнений у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций до и после лечения

А. Проведение персонализированной иммунотерапии. Б. Общепринятое консервативное лечение. По оси ординат — доля детей, %. * — значение достоверно отличается от значения до лечения ($p < 0,05$)

Таким образом, комплекс цитокинов и противомикробных пептидов оказывал иммуномодулирующее действие на показатели врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций [3, 9].

Выводы

1. Применение аутологичного комплекса иммунопептидов, включающего цитокины и противомикробные пептиды, вырабатываемые лейкоцитами пациента, приводило к нормализации носового дыхания, снижению частоты развития отитов и ОРВИ в течение 6 мес наблюдения после лечения.

2. Выявлены индивидуальные различия в экспрессии генов молекул врожденного иммунитета в слизистой оболочке полости носа у детей с гипертрофией

аденоидных вегетаций, что дает основание для персонализированного подхода к иммунотерапии.

Исследование выполнено в рамках приоритетного направления развития «Персонализированная медицина» Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова.

Литература

1. Хабриев Р.У., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Долгина Е.Н. Метод персонализированной иммунотерапии (Медицинская технология). М.: ФС №2011/212 от 28.07.2011.
2. Снимщикова И.А. Иммунопатогенетическая и клиническая характеристика эффективности локальной иммунокоррекции при некоторых гнойно-воспалительных заболеваниях: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Курск, 2001. 42 с.
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. Локальная иммунокоррекция цитокинами // Аллергол. и клин. иммунол. 1999. №1. С.64–71.
4. Вавилова В.П., Гаращенко Т.И. Квантовая терапия в комплексном лечении часто болеющих детей с хроническим аденоидитом. М.: ЗАО «Милта-ПКП ГИТ», 2009. 151 с.
5. Богомилский М.Р., Чистякова В.Р. Детская оториноларингология. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 660 с.
6. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Игнатъева Г.А. Иммунология: Практикум. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. С.169.
7. Крамер Г. Математические методы статистики. М.: Мир, 1975. С.55–67.
8. Matsumura T., Hayashi H., Takii T. et al. TGF- β down-regulates IL-1 α -induced TLR2 expression in murine hepatocytes // J. Leukoc. Biol. 2004 June. V.75. P.76–79.
9. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 640 с.

Информация об авторах:

Рахманова Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, заведующая НИЛ клинической и экспериментальной детской оториноларингологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (499) 236-4538
E-mail: irenalor@gmail.com

Свитич Оксана Анатольевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН, ведущий научный сотрудник Центра персонализированной медицины Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а
Телефон: (495) 674-5501
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Зинкер Георгий Михайлович, кандидат медицинских наук, заведующий поликлиникой, руководитель амбулаторно-поликлинической службы Морозовской детской городской клинической больницы
Адрес: 117049, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1
Телефон: (499) 764-5689

Ганковский Виктор Анатольевич, аспирант кафедры оториноларингологии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-5467
E-mail: lgan@yandex.ru

Карташов Дмитрий Дмитриевич, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры общей и клинической иммунологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-5467
E-mail: dmkartashov@yandex.ru

Волкова Юлия Валерьевна, студентка VI курса медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-5467

Руссанова Ксения Владимировна, студентка VI курса медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-5467

ИЗ ЖИЗНИ УНИВЕРСИТЕТА

Учебники и монографии

Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 640 с.

В основу учебника положен многолетний опыт преподавания современной общей и клинической иммунологии на кафедре иммунологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова и на кафедре клинической иммунологии и аллергологии Смоленской медицинской академии. Методология изложения материала построена на современных представлениях о том, что предмет клинической иммунологии – иммунная система организма, ее структурные и функциональные особенности в норме и при патологии. В связи с этим основное внимание уделяется изложению ключевых вопросов общей иммунологии, дающих знания об иммунной системе человека и ее врожденном и приобретенном компонентах, а также наиболее важных тем клинической иммунологии, включая иммунопатологию, оценку иммунного статуса человека, генетически опосредованные и приобретенные иммунодефициты, аллергические заболевания, иммунотерапию и иммунопрофилактику. Учебник предназначен для студентов медицинских вузов, клинических ординаторов, аспирантов, аллергологов-иммунологов.