

## ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ АДЕНОИДНЫХ ВЕГЕТАЦИЙ

М. Р. Богомильский<sup>1</sup>, О. А. Свитич<sup>1✉</sup>, В. А. Ганковский<sup>2</sup>, И. В. Рахманова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

<sup>2</sup> Научный центр здоровья детей, Москва

Были изучены уровни экспрессии генов Toll-подобных рецепторов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и генов противомикробных пептидов *HBD1*, *HBD2* и *HNP1*, участвующих в реализации врожденного иммунитета, у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций II и III степени и здоровых детей. Пациентов разделили на 3 группы: тех, кому была показана консервативная терапия (группа I, 39 участников), тех, кому была произведена аденотомия (группа II, 38 участников), и контрольную группу (33 участника). В качестве клинического материала использовали соскоб эпителиальных клеток слизистой полости носа (группа I и контроль) и соскоб со слизистой глоточной миндалины (группа II). Достоверных различий в экспрессии генов по типу биологического материала не наблюдали. Уровни экспрессии изучаемых генов в группе I не отличались достоверно от показателей контрольной группы. В группе II было отмечено достоверное увеличение экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* (в 15,4 и 10,3 раза соответственно при  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой, при этом уровень экспрессии гена *TLR9* ниже в 5 раз, гена *HBD1* — в 33,4 раза, *HBD2* — в 21 раз, *HNP1* — в 3,4 раза. Такие дефекты защитных механизмов могут вести к осложнениям заболевания и могут являться дополнительным показанием к хирургической операции.

**Ключевые слова:** гипертрофия аденоидных вегетаций, эндоскопическая аденотомия, врожденный иммунитет, Toll-подобные рецепторы, противомикробные пептиды, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HBD1*, *HBD2*, *HNP1*

✉ Для корреспонденции: Оксана Анатольевна Свитич  
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1; svitichoa@yandex.ru  
Статья получена: 14.09.2015 Статья принята в печать: 22.10.2015

## INNATE IMMUNITY FEATURES IN HEALTHY CHILDREN AND IN CHILDREN WITH ADENOID HYPERTROPHY

Bogomilsky MR<sup>1</sup>, Svitich OA<sup>1✉</sup>, Gankovskiy VA<sup>2</sup>, Rakhmanova IV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

<sup>2</sup> Scientific Center of Children's Health, Moscow

In this study we examined expression levels of *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* genes and *HBD1*, *HBD2* and *HNP1* antimicrobial peptides genes, which are part of the innate immunity, in children with grade II and grade III adenoid hypertrophy and healthy children. The patients were divided into three groups: those with indications for conservative treatment (group I, 39 participants), those with prior adenoidectomy (group II, 38 participants) and healthy controls (33 participants). Clinical material was presented by epithelial cells scraped from nasal mucosa (group I and control group) and pharyngeal tonsils scrapes (group II). No significant difference in gene expression based on the type of biological material was observed. The expression levels of the genes inspected in group I did not differ significantly from those in the control group. Group II displayed a significantly increased expression of *TLR2* and *TLR4* genes (15.4 and 10.3 times respectively with  $p < 0.05$ ) in comparison with the control group, with *TLR9* gene expression level being 5 times lower, *HBD1* gene expression — 33.4 times lower, *HBD2* gene expression — 21 times lower, *HNP1* gene expression — 3.4 times lower. Such defects in defense mechanisms can lead to disease complications and be an additional indication for surgery.

**Keywords:** adenoid hypertrophy, endoscopic adenoidectomy, innate immunity, Toll-like receptors, antimicrobial peptides, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HBD1*, *HBD2*, *HNP1*

✉ Correspondence should be addressed: Oksana Svitich  
1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997; svitichoa@yandex.ru  
Received: 14.09.2015 Accepted: 22.10.2015

Заболевания лимфоглоточного кольца Вальдейра–Пирогова являются актуальной проблемой в детской оториноларингологии, [1, 2]. Отмечается тенденция к увеличению частоты встречаемости гипертрофии глоточной миндалины у детей, что в свою очередь ведет к увеличению количества оперативных вмешательств [3]. На вопрос, является ли приоритетным хирургический или консервативный метод лечения, по-прежнему нет однозначного ответа [4].

Гипертрофия аденоидных вегетаций (гипертрофия АВ) сопровождается частыми ОРВИ, нарушением носового дыхания, различными формами средних отитов. В лимфоидной ткани носоглотки формируется мукозальный иммунитет ЛОР-орга-

нов, и разработка и внедрение в клиническую практику молекулярно-генетических методов исследования врожденного иммунитета позволит сформулировать и научно обосновать новые подходы к иммунотропной терапии с учетом индивидуальных особенностей иммунной системы пациента.

В последние годы достигнуты успехи в изучении роли распознающих рецепторов врожденного иммунитета — Toll-подобных рецепторов (TLR) и их роли в патогенезе различных заболеваний человека [5, 6]. Распознавание патогенов и эндогенных лигандов TLR запускает активацию генов цитокинов, противомикробных пептидов (ПМП) и других молекул [5, 7]. Дефекты в системе TLR могут привести к развитию тяжелых

инфекций, аутоиммунных заболеваний, аллергопатологий. Целью нашего исследования являлся анализ уровней экспрессии генов распознающих рецепторов (*TLR2*, *TLR4*, *TLR9*) и противомикробных пептидов (альфа-дефенсин — *HBD1* и бета-дефенсина — *HBD2* и *HNP1*) у здоровых детей и у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критериями для включения в исследование являлось наличие у детей в возрасте от 2 до 7 лет гипертрофии АВ II и III степени, отсутствие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний и обострения хронических заболеваний, аллергопатологий, а также отсутствие аденоидита в течение месяца до начала исследования. Нами были обследованы 110 детей, находившихся на лечении в клинико-диагностическом центре и ЛОР-отделении Морозовской детской городской клинической больницы (г. Москва).

Пациенты с гипертрофией АВ были разделены на две группы в зависимости от клинических проявлений. В одну группу включили 39 пациентов, у которых преимущественно отмечалось затруднение носового дыхания, гнусавость, храп в ночное время, частые ОРВИ (группа I). Эти пациенты нуждались только в консервативной терапии. В другую группу включили 38 пациентов, у которых наблюдались частые острые средние отиты, экссудативные средние отиты, снижение слуха (группа II). У 95 % детей этой группы при эндоскопическом исследовании носоглотки определялся блок глоточных устьев слуховых труб. Этим детям произвели эндоскопическая аденотомию под интубационным наркозом. В контрольную группу включили 33 здоровых ребенка в возрасте от 2 до 7 лет I группы здоровья. Пациенты болели острыми вирусными заболеваниями не чаще чем 1–2 раза в год [8].

Всем пациентам было проведено эндоскопическое исследование полости носа и носоглотки жесткими и гибкими оптическими системами, которое позволяет оценить форму носоглотки и расположенной в ней лимфоидной ткани, пролабирование в задние отделы полости носа, предлежание к хоанам, ее расположение в носоглотке по отношению к глоточным устьям слуховых труб. Также была произведена тимпанометрия. Все пациенты были обследованы ЛОР-аллергологом для исключения аллергопатологии.

Поскольку эпителий является полноправным участником системы врожденного иммунитета [9], в качестве клинического материала в работе использовали соскоб эпителиальных клеток слизистой полости носа, полученный с помощью «цитощеточки», тип D (для группы I и контрольной группы), а также соскоб со слизистой глоточной миндалины, полученный во время проведения эндоскопической аденотомии (для группы II). Получение и обработку клинического материала проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» Центрального НИИ эпидемиологии [10].

Для определения уровней экспрессии генов *TLR* и генов противомикробных пептидов выделяли РНК из биологического материала при помощи комплекта реагентов «РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия). Выделенную РНК использовали

как матрицу для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции с использованием набора «Реверта» («ИнтерЛабСервис», Россия). На последнем этапе ставили полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ). Последовательность праймеров для генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *HBD1*, *HBD2*, *HNP1* подбирали с помощью программы Vector NTI 8.0, анализируя последовательности, полученные из электронной базы данных GenBank. Реакцию проводили в амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия). Все реакции проводили в строгом соответствии с протоколами фирм-производителей. Последовательность операций представлена на рисунке 1.

Статистический анализ проводили с использованием общепринятых статистических методов [11]. Полученные данные обрабатывали на персональном компьютере с помощью программ BioStat и Microsoft Excel. Для сравнения двух групп использовали критерий Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ показателей врожденного иммунитета у пациентов с гипертрофией АВ II и III степени, которым было показано консервативное лечение (группа I), не выявил достоверных различий в уровнях экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *HBD1*, *HBD2*, *HNP1* в сравнении с показателями контрольной группы. У детей группы II наблюдалось достоверное увеличение экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, отвечающих за распознавание бактериальных патогенов: экспрессия гена *TLR2* была увеличена в 15,4 раза ( $p < 0,05$ ), *TLR4* — в 10,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой (рис. 2, А; таблица). Уровень экспрессии гена *TLR9* в этой группе был ниже в 5 раз, гена *HBD1* — в 33,4 раза, *HBD2* — в 21 раз, *HNP1* — в 3,4 раза по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 2, Б; таблица).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

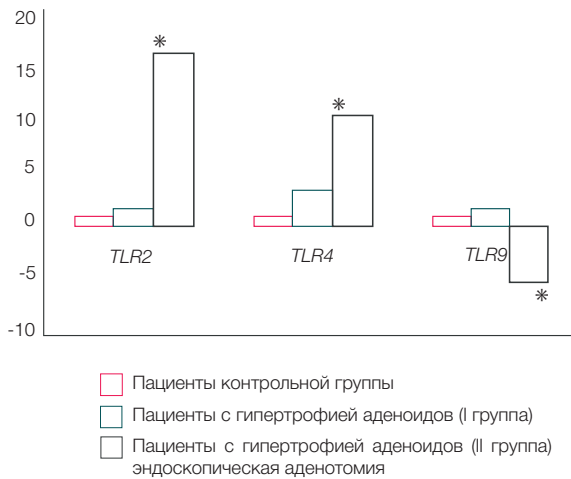
Полученные для группы I данные представляются важными, так как в комплексе с другими методами обследования позволяют обосновать консервативное лечение гипертрофии аденоидных вегетаций. Отсутствие изменений в показателях врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа может явиться важным критерием для сохранения глоточной миндалины. Однако, сохраняя свою функцию, гиперплазированная лимфоидная ткань носоглотки в ряде случаев может быть причиной развития патологических изменений, носящих как местный характер (ринит, острый синусит, средний отит и др.), так и общий (нарушение обмена веществ, замедленный рост ребенка, гипоксия и др.) [1]. В этом случае следует применять хирургический метод лечения — аденотомию с помощью эндоскопической техники.

Выявлен дефект в механизмах защиты слизистой оболочки полости носа у детей группы II. Резкое увеличение уровня экспрессии генов *TLR2* и *TLR4* сочетается сниженной экспрессией генов эффекторных молекул противомикробных пептидов. Дисбаланс в распознающих и эффекторных моле-



Рис. 1. Последовательность операций по определению экспрессии генов Toll-подобных рецепторов и противомикробных пептидов

А - Экспрессия генов TLRs



Б - Экспрессия генов ПМП

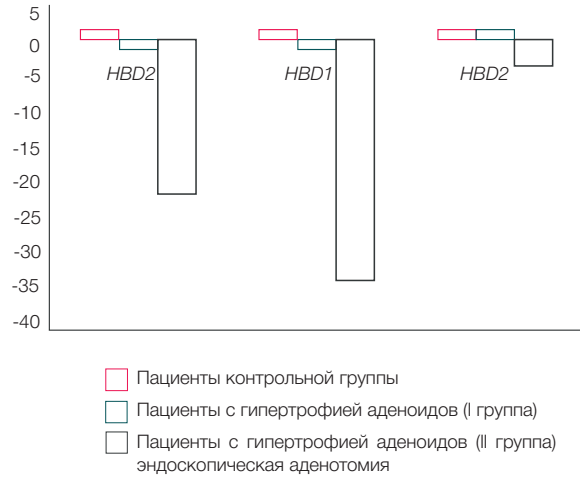


Рис. 2. Экспрессия генов молекул врожденного иммунитета в клетках слизистой оболочки полости носа у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций. (А) Экспрессия генов TLRs. (Б) Экспрессия генов противомикробных пептидов. По оси ординат представлены показатели экспрессии генов в относительных единицах, определяемых как отношение абсолютного значения количества копий исследуемого гена в группах I и II к таковому у здоровых детей, принятым за единицу. \*р <0,05

кулах врожденного иммунитета может быть одной из причин развития аденоидита, гипертрофии лимфоидной ткани носоглотки, которая в свою очередь может приводить к блоку глоточных устьев слуховых труб и средним отитам. Сниженная экспрессия гена *TLR9* в группе II может свидетельствовать о дефекте противовирусной защиты слизистой оболочки, поскольку лигандами для рецептора *TLR9* является ДНК вирусов. Выявленные изменения в показателях врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа могут служить дополнительными причинами проведения поднаркозной эндоскопической аденотомии.

Необходимо отметить, что уровень экспрессии изучаемых генов не различался по типу образца клинического материала (рис. 3). Наши результаты согласуются с данными Lesmeister M., который выявил уровни экспрессии генов всех десяти Toll-подобных рецепторов в эпителии слизистой небных и глоточной миндалин [12]. В работе В. П. Быковой и соавт. с помощью иммуногистохимического метода продемонстрирована экспрессия генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* в эпителиальных структурах небных и глоточной миндалин, удаленных по поводу гипертрофии, хронического тонзиллита и хронического аденоидита [13]. По мнению этих авторов, TLR отводится ведущая роль в иммунологической защите слизистых ЛОР-органов.

На основании наших результатов можно представить схематически роль факторов врожденного иммунитета в па-

тогенезе воспалительных заболеваний ЛОР-органов (рис. 4). Инфекционные агенты через активацию TLRs в клетках слизистой полости носа и лимфоидного кольца приводят к продукции эпителиальными клетками важных эффекторных молекул — дефенсинов [14]. Дефенсины, оказывая прямое противомикробное действие, защищают слизистые от патогенов [15]. Гиперэкспрессия генов TLR небезопасна для организма [16].

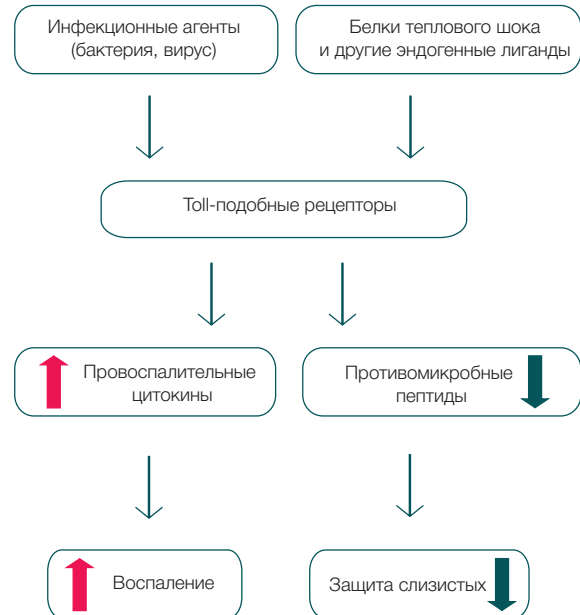


Рис. 4. Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе заболеваний ЛОР-органов

ВЫВОДЫ

Значительное увеличение уровней экспрессии генов TLR с одновременным снижением экспрессии генов противомикробных пептидов приводит к снижению защиты слизистых оболочек и может быть одной из причин развития аденоидитов и средних отитов. Это может быть дополнительным обоснованием хирургического метода лечения.

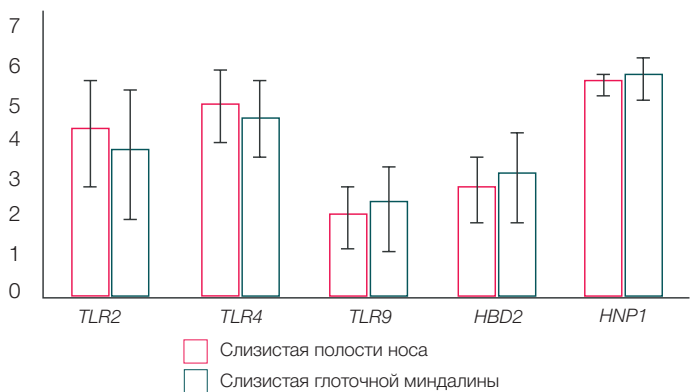


Рис. 3. Экспрессия генов молекул врожденного иммунитета в клетках слизистой оболочки полости носа и слизистой глоточной миндалины у детей группы I. По оси ординат представлены показатели экспрессии генов в lg копий кДНК по отношению к lg 1 млн количества копий актина.

## Литература

1. Богомилский М. Р., Чистякова В. Р. Детская оториноларингология: учебник для вузов. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 576 с.
2. Крюков А. И., Архангельская И. И., Кунельская В. Я., Ивойлов А. Ю., Мачулин А. И. Лечебно-диагностические критерии выбора метода лечения аденоидных вегетаций как очага хронической инфекции в детском возрасте. Вестник оториноларингологии. 2008; 3: 29–31.
3. Гаращенко Т. И., Зеленкова И. В., Алферова М. В. Иммуномодуляторы топического применения в профилактике и лечении хронического аденоидита у детей. Вестник оториноларингологии. 2011; 2: 62–5.
4. Быкова В. П., Бруевич О. А. и др. Аденоиды как индуктивный орган мукозального иммунитета верхних дыхательных путей. Российская ринология. 2005; 2: 175–6.
5. Janeway C, Travers J, Walport V, Shlomchik MJ. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed. New-York: Garland Science; 2005.
6. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 640 с.
7. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 752 с.
8. Шабалов Н. П. Детские болезни: учебник в 2 т. 5-е издание. Т. 1. СПб.: Питер; 2002. 832 с.
9. Ooi EH, Wormald PJ, Tan LW. Innate immunity in the paranasal sinuses. American J. of Rinology. 2008; 1: 13–9.
10. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики. М., 2012. 32 с.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999. 459 с.
12. Brook I. Effects of antimicrobial therapy on the microbial flora of the adenoids. J Antimicrob Chemother. 2003; 51 (6): 1331–7.
13. Гусева Е. Д., Файзуллина Р. М. Особенности мукозального иммунитета у детей с аллергическим ринитом. Вестник оториноларингологии. 2012; 6: 33–5.
14. Ковальчук Л. В., Свитич О. А., Ганковская Л. В. и др. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2012; 2: 147–53.
15. Свитич О. А., Ганковская Л. В., Рахманова И. В. и др. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFB 1, с гипертрофией аденоидных вегетаций. Вестник РГМУ. 2012; 3: 59–62.
16. Бахарева И. В., Ганковская Л. В., Ковальчук Л. В. и др. Прогностическое значение экспрессии генов молекул врожденного иммунитета (TLR2, TLR4 и HBD1) при невынашивании беременности. Лечащий врач. 2012; 9: 84–91.

## References

1. Bogomilskiy MR, Chistyakova VR. Detskaya otorinolaringologiya: uchebnik dlya vuzov. 2nd ed. M.: GEOTAR-Media; 2007. 576 p. Russian.
2. Kryukov AI, Arkhangelskaya II, Kunel'skaya VYa, Ivoylov AYU, Machulin AI. Lechebno-diagnosticheskie kriterii vybora metoda lecheniya adenoidnykh vegetatsiy kak ochaga khronicheskoy infektsii v detskom vozraste. Vestnik otorinolaringologii. 2008; 3: 29–31. Russian.
3. Garaschenko TI, Zelenkova IV, Alferova MV. Immunomodulatory topicheskogo primeneniya v profilaktike i lechenii khronicheskogo adenoidita u detei. Vestnik otorinolaringologii. 2011; 2: 62–5. Russian.
4. Bykova VP, Bruevich OA., i soavt. Adenoidy kak induktivniy organ mukozal'nogo immuniteta verkhnikh dykhatel'nykh putey. Rossiyskaya rinologiya. 2005; 2: 175–6. Russian.
5. Janeway C, Travers J, Walport V, Shlomchik MJ. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed. New-York: Garland Science; 2005.
6. Kovalchuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obschey immunologii. M.: GEOTAR-Media; 2011. 640 p. Russian.
7. Yarilin AA. Immunologiya. M.: GEOTAR-Media; 2010. 752 p. Russian.
8. Shabalov NP. Detskie bolezni: uchebnik v 2 t. 5th ed. T. 1. SPb.: Piter; 2002. 832 p. Russian.
9. Ooi EH, Wormald PJ, Tan LW. Innate immunity in the paranasal sinuses. American J. of Rinology. 2008; 1: 13–9.
10. Tsentral'niy nauchno-issledovatel'skiy institut epidemiologii. Vzyatie, transportirovka, khranenie klinicheskogo materiala dlya PtsR-diagnostiki. M., 2012. 32 p. Russian.
11. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. M.: Praktika; 1999. 459 z. Russian.
12. Brook I. Effects of antimicrobial therapy on the microbial flora of the adenoids. J Antimicrob Chemother. 2003; 51 (6): 1331–7.
13. Guseva ED, Fayzullina RM. Osobennosti mukozal'nogo immuniteta u detey s al-lergicheskim rinitom. Vestnik otorinolaringologii. 2012; 6: 33–5. Russian.
14. Kovalchuk LV, Svitich OA, Gankovskaya LV, i soavt. Rol' Toll-podobnykh retseptorov v patogeneze infektsionnykh zabolevaniy cheloveka. Kurskiy nauchno-prakticheskii vestnik "Chelovek i ego zdorov'e". 2012; 2: 147–53. Russian.
15. Svitich OA, Gankovskaya LV, Rakhmanova IV, i soavt. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov, lokalizovannykh v 5'-netarnsliuemyy oblasti gena DEFB 1, s gipertrofiei adenoidnykh vegetatsii. Vestnik RGMU. 2012; 3: 59–62. Russian.
16. Bakhareva IV, Gankovskaya LV, Kovalchuk LV, i soavt. Prognosticheskoe znachenie ekspressii genov molekul vrozhdenного immuniteta (TLR2, TLR4 i HBD1) pri nevyynashivaniy beremennosti. Lechaschiy vrach. 2012; 9: 84–91. Russian.