

**О.С. Бычкова^{1,2}, В.Ф. Коколина³, И.Н. Кузетченко¹,
В.Х. Маремкулов⁴, А.М. Барина³, Т.Г. Дядик¹**

¹ Российская детская клиническая больница, Москва

² Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.Н. Пирогова, Москва

⁴ Научно-исследовательский институт иммунопатологии, Москва

Особенности иммунного статуса у детей и подростков с папилломавирусной инфекцией аногенитальной области

В статье приведены данные иммунологического обследования 27 детей с папилломавирусной инфекцией аногенитальной области в возрасте от 2 до 12 лет до лечения и 17 детей по окончании лечения. В качестве терапии данного заболевания предложен трехэтапный способ комбинированной терапии: три курса интерферонотерапии препаратом интерферона $\alpha 2b$ в свечах, местно – глицирризиновая кислота, при необходимости – лазерная деструкция кондилом.

Ключевые слова: аногенитальные кондиломы, папилломавирусная инфекция, дети и подростки, комбинированная терапия.

Контактная информация: Бычкова Оксана Сергеевна. E-mail: kasana@list.ru

© Коллектив авторов, 2012

Состояние местного и системного иммунитета играет ключевую роль в течении и исходе папилломавирусной инфекции аногенитальной области (ПВИ АГО). Важная роль в контроле ПВИ принадлежит клеточному звену иммунитета [1]. Это подтверждает множество исследований, проведенных у пациентов разных групп с иммуносупрессией, а именно: у пациентов с почечными трансплантатами,

получающих иммунодепрессанты, подавляющие активность клеточного звена иммунитета, которые находятся в группе риска развития кожной или генитальной ПВИ [2]. Общий дефицит Т-клеточного звена иммунитета, например при ВИЧ-инфекции, также ассоциируется с увеличением риска развития аногенитальной неоплазии в 5,4 раза [3].

O.S. BYCHKOVA, V.F. KOKOLINA, I.N. KUZETCHENKO, V.H. MAREMKULOV, A.M. BARINOVA, T.G. DYADIK

Peculiar features of the immune status of children and adolescents with anogenital HPV infection

The paper provides findings from an immunological survey of 27 children with anogenital HPV infection aged 2 to 12 years before treatment and 17 patients after termination of treatment. As treatment modality for this condition a three-pronged combination therapy is suggested, consisting of three courses of interferon $\alpha 2b$ in the form of rectal suppositories, the application of glycyrrhizic acid topically and laser destruction of warts to be carried out if required.

Key words: anogenital condyloma, human papillomavirus infection, immunological survey, children and adolescents, combination therapy.

Инфекция, вызванная вирусом папилломы человека (ВПЧ), не имеет литического характера, что приводит к низкой концентрации свободных вирусных антигенов. Кроме того, отсутствует продукция цитокинов воспаления, не наблюдается местной воспалительной реакции при моноинфекции ВПЧ. Исходя из этого оптимальная стратегия лечения ВПЧ-инфекции может включать в себя стимуляцию вирусоспецифического иммунного ответа путем усиления местного воспаления и продукции соответствующих цитокинов. Поскольку вирус эпителиотропен, большое значение имеют системы местной защиты: барьерная функция эпителия, гуморальные (лизоцим, иммуноглобулины, интерлейкины, интерфероны, ростовые факторы) и клеточные факторы (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, клетки Лангерганса). В стадии изучения находятся роль антигенпрезентирующих клеток в развитии Т-зависимого ответа на ВПЧ-инфекцию, механизмы ускользания вируса от контроля иммунной системы, приводящие к персистенции инфекции и злокачественной трансформации патологических очагов. Антигенспецифичные Т-клетки узнают ранние белки ВПЧ, определяющие вирусную репликацию (Е1 и Е2) и пролиферацию тканей (Е6 и Е7). В последние годы пристальное внимание направлено на изучение функциональной дихотомии цитокинов: с одной стороны, они участвуют в регуляции клеточного иммунного ответа, с другой – в регуляции гуморального ответа. Секретция цитокинов осуществляется Т-лимфоцитами. Активированные Т-хелперы 1-го типа (Th 1) секретируют интерферон γ (INF- γ), фактор некроза опухоли (TNF) и IL-2, стимулирующие клеточный ответ. С другой стороны, Т-хелперы 2-го (Th 2) типа секретируют IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, стимулирующие гуморальный ответ. Доказано, что при развитии Th 1-ответа на инфицирование клеток ВПЧ развивается эффективный иммунный ответ, способствующий элиминации вируса из организма. При иммуногистохимическом исследовании биоптатов ВПЧ-инфицированного эпителия шейки матки при РШМ обнаружено преобладание Th 2-клеток над Th 1 по сравнению с нормальным цервикальным эпителием [4].

Проводятся исследования по выявлению взаимосвязи между уровнем сероконверсии иммуноглобулинов и фазами инфекционного процесса при ВПЧ. Так, в двух крупнейших исследованиях было показано, что при инфицировании ВПЧ 16 типа сероконверсия иммуноглобулинов класса G (Ig G) отмечена в одном случае у 73%, в другом – у 56,7% женщин. Выявление антител к ВПЧ чаще ассоциировано с персистирующей формой инфекции [5, 6].

В исследовании *Onda et al* определяли иммуноглобулины класса A (Ig A) к ВПЧ 16 типа. Обнаружено, что IgA в секрете цервикального канала начинает

определяться в среднем через 10,5 мес после обнаружения ДНК ВПЧ 16 типа, а в сыворотке крови – в среднем через 19,1 мес. При этом до конца не определены механизмы иммунного ответа на антигены (АГ) ВПЧ и то, как антитела (АТ) могут защитить от повторного заражения [7].

Изучение механизмов взаимодействия клеточно-го звена иммунной системы с ВПЧ продолжается. Необходимо полное понимание роли системного и местного иммунитета для выработки новых стратегий терапевтической и профилактической вакцинации против ВПЧ-инфекции [8].

Цель исследования: разработать патогенетически обоснованную терапию ПВИ АГО у детей и подростков с учетом результатов исследования иммунного статуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследований, выполненных в отделениях лазерной хирургии и детской гинекологии Российской детской клинической больницы, проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 135 детей и подростков, больных ПВИ АГО, с оценкой общего состояния их здоровья и выявлением факторов, возможно, влияющих на состояние и реактивность иммунной системы. Проведено исследование иммунного статуса у 27 детей с ПВИ АГО в возрасте от 2 до 12 лет до интерферонотерапии и у 17 пациентов после лечения. Схема лечения включала три этапа.

Первый этап (1–4-я нед): курс интерферонотерапии препаратом интерферона $\alpha 2b$ в свечах *per rectum*. У детей до 7 лет мы применяли свечи Генферон Лайт (ЗАО «Биокад», Россия) в дозировке 125 тыс. ЕД; у детей старше 7 лет – 250 тыс. ЕД, 2 раза в сутки с 12-часовым интервалом в течение 10 дней с последующим 3-недельным перерывом. Местно назначали препарат глицирризиновой кислоты (Эпиген интим спрей, Хеминова Интернасьональ С.А., Испания) на очаги поражения, 4–6 раз в день, 4 нед.

Второй этап (5–8-я нед): на фоне второго курса интерферонотерапии по указанной выше схеме проводили лазерную деструкцию оставшихся патологических очагов. В послеоперационном периоде в течение 10 дней для ускорения регенерации проводили курс низкоинтенсивной лазерной терапии гелий-неоновым лазером с длиной волны 0,63 мкм.

Третий этап (9–10-я нед): профилактический курс интерферонотерапии по указанной выше схеме.

Для оценки иммунного статуса у пациентов изучали состояние клеточного и гуморального иммунитета по показателям периферической венозной кро-

ви. Фенотипирование субпопуляций лимфоцитов проводили методом иммуофлюоресценции с использованием моноклональных антител к поверхностным клеточным кластерам дифференцировки антигенов (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, В-лимфоциты). Определяли уровень сывороточных иммуноглобулинов (А, М, G) методом турбодиметрического анализа. Интерфероновый статус оценивали по концентрации ИФ α и ИФ γ в сыворотке крови – по задержке деструкции монослота диплоидной культуры фибробластов после внесения тест-вируса. Результаты исследований системного иммунитета больных до лечения сравнивались с нормативными данными [8]. По окончании иммуностропной терапии сравнивали показатели до и после лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выявления факторов риска было обнаружено, что в анамнезе у 75 (55,5%) пациентов – частые респираторные вирусные инфекции (от 4 до 7 эпизодов за предшествующий год), однако среднее значение в подгруппах (3,69 \pm 0,5) не выходит за пределы нормы. У 37 (27,4%) детей отмечено появление или усиление роста кондилом после перенесенного простудного заболевания. Наиболее распространенная сопутствующая соматическая патология – аллергические заболевания (атопический дерматит, пищевая аллергия, бронхиальная астма) – 37 (27,4%) детей. Болезни верхних дыхательных путей (хронические тонзиллиты, синуситы, аденоиды), суммарная доля которых составила 15,5%, занимают второе место по встречаемости в группе детей, больных ПВИ АГО. Заболевания желудочно-кишечного тракта встречались в 13,3% случаев.

При сравнении данных, полученных в ходе иммунологического обследования до лечения, с нормативными показателями, статистически достоверными были отклонения в группе детей 2–5 лет (n=16) и 6–12 лет (n=11). Данные иммунодиагностики у детей с ВПЧ-инфицированием показали наличие транзиторных изменений показателей как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета, обусловленных не только наличием инфицирования ВПЧ, но и фоновым состоянием здоровья.

Для детей от 2 до 5 лет с ПВИ АГО (n=16) до проведения иммуностропного лечения характерны следующие изменения в иммунограмме (рис. 1):

- ниже порога физиологических колебаний находилось общее абсолютное количество лимфоцитов у 87,5% и В-лимфоцитов – у 37,5% детей;

- выраженное повышение доли CD25 клеток, синтезирующих ИЛ2, отмечалось у 50%, увеличение абсолютного количества – у 31,25% пациентов; парал-

- ельное увеличение доли Т-цитотоксических клеток – у 50%, увеличение абсолютного их количества – у 75% пациентов; увеличение доли натуральных киллерных (НК) клеток – у 50%, абсолютного их количества – у 68,75% пациентов;

- почти двукратное снижение индекса иммунной регуляции (ИРИ) по соотношению CD4/CD8 в абсолютных значениях у 75% пациентов.

При изучении иммунограмм и сравнении показателей частоты отклонений от нормы до и после иммуностропного лечения у детей этой же возрастной группы (n=10) после трех курсов интерферонотерапии по указанной выше схеме наиболее достоверными были следующие изменения:

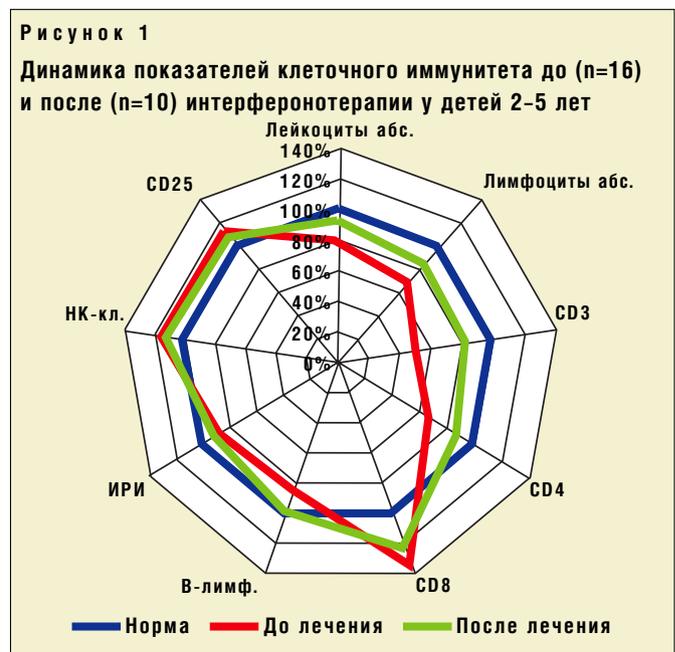
- положительная динамика в сторону нормализации изначально сниженных уровней абсолютного числа лимфоцитов ($\phi=0,4$; $p=0,002$), абсолютного числа CD3-лимфоцитов ($\phi=0,85$; $p=0,000$), доли и абсолютного числа CD4-лимфоцитов (соответственно $\phi=0,17$; $p=0,045$ и $\phi=0,345$; $p=0,004$);

- снижение до нормальных значений изначально повышенного уровня CD8-лимфоцитов: доли и абсолютного числа (соответственно $\phi=0,17$; $p=0,045$ и $\phi=0,196$; $p=0,032$);

- приближение к нормальным значениям изначально сниженного показателя ИРИ ($\phi=0,196$; $p=0,032$);

- снижение до нормальных значений содержания НК-клеток ($\phi=0,17$; $p=0,045$) с тенденцией к нормализации их абсолютного числа ($\phi=0,14$; $p=0,063$).

Отмечена тенденция к нормализации показателей В-лимфоцитов: $\phi=0,14$; $p=0,063$; абсолютное число: $\chi^2=2,6$; $p=0,1$.



Проведенный курс иммуностропного лечения не оказал статистически достоверного влияния на абсолютное количество лейкоцитов (рис. 2).

В иммунограмме детей 2–5 лет с ПВИ АГО до лечения отмечено:

- увеличение концентрации сывороточных IgA в 43,75% случаев при наличии физиологических уровней IgG и IgM в периферической венозной крови;

- снижение уровня ИФа у 75% пациентов и уровня ИФу у 50% ниже нижнего значения нормы на фоне двукратного увеличения значения сывороточного ИФ (50% случаев).

После комбинированного лечения с использованием препарата ИФа (Генферон Лайт) в свечах отмечено статистически достоверное повышение уровня ИФа и снижение изначально повышенного уровня сывороточного интерферона на фоне проводимой терапии ($\varphi=0,196$; $p=0,032$ и $\varphi=0,17$; $p=0,045$). Проведенный курс иммуностропного лечения не оказал статистически достоверного влияния на уровень иммуноглобулинов и ИФу.

При изучении показателей иммунитета у детей от 6 до 12 лет с ПВИ АГО до (n=11) и после (n=7) проведения трех курсов интерферонотерапии препаратом ИФ (Генферон Лайт) выявлены следующие изменения (рис. 3, 4).

В данной возрастной группе (рис. 3):

- ниже физиологического уровня колебаний было абсолютное количество лейкоцитов у 45,45% детей; содержание и абсолютное количество лимфоцитов – у 45,45%; снижение доли и абсолютного числа CD3-лимфоцитов – у 54,54%;

- ниже физиологического уровня колебаний были доля и абсолютное число CD4-лимфоцитов – соответственно у 72,72 и 63,63% детей;

- умеренное повышение числа клеток CD25, синтезирующих ИЛ2 (в процентном соотношении и абсолютном количестве), – у 35,36% пациентов; параллельное увеличение доли и абсолютного числа CD8-лимфоцитов – соответственно у 72,72 и 63,63% пациентов, а также процентного содержания и абсолютного количества НК-клеток в 54,54% случаев;

- выше физиологических значений были показатели доли и абсолютного количества CD8-лимфоцитов – соответственно у 72,72 и 63,63% пациентов.

- показатель ИРИ ниже нормальных значений отмечен в 63,63% случаев;

- доля и абсолютное количество В-лимфоцитов было снижено у 54,54% детей.

После проведения интерферонотерапии в данной группе детей наиболее достоверными были изменения в сторону нормализации показателей абсолютного числа и доли лейкоцитов ($\varphi=0,24$, $p=0,049$) и лимфоцитов ($\varphi=0,24$, $p=0,049$), а также доли CD4-лимфоцитов ($\varphi=0,31$, $p=0,025$), CD8 ($\varphi=0,31$, $p=0,025$), НК-клеток ($\varphi=0,31$, $p=0,025$). Отмечена тенденция ($p \leq 0,1$) к нормализации абсолютного количества CD3, CD4, CD8, НК-клеток, CD25-лейкоцитов, а также показателя ИРИ. Динамика показателей интерферонов и иммуноглобулинов у детей 6–12 лет с ПВИ АГО до (n=11) и после (n=7) иммуностропной терапии представлена на рисунке 4.

Рисунок 2

Динамика интерферонов и иммуноглобулинов А, М, G до и после лечения у детей от 2 до 5 лет

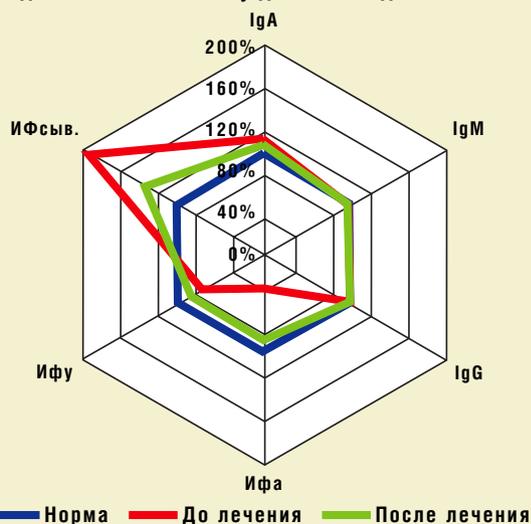
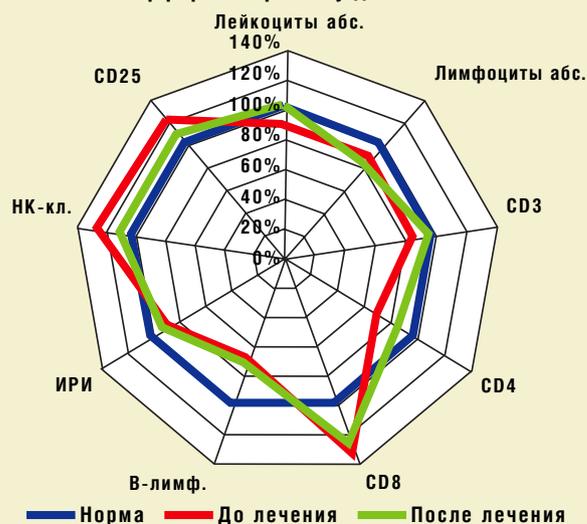


Рисунок 3

Динамика показателей клеточного иммунитета до и после интерферонотерапии у детей 6–12 лет



В группе детей 6–12 лет уровень ИФ α был ниже физиологических колебаний у 72,72% детей, после интерферонотерапии – у 14,28% ($\varphi=0,31$, $p=0,025$). Уровень ИФ γ до интерферонотерапии был снижен в 63,63% случаев, после нее – в 42,85% ($\varphi=0,04$, $p=0,352$). Повышенный уровень сывороточного ИФ до лечения был отмечен у 54,54% детей, после интерферонотерапии – у 14,28% ($\varphi=0,12$, $p=0,1$). Уровень иммуноглобулинов и динамика показателей на фоне интерферонотерапии не выходили за пределы нормативных значений.

При сравнении полученных данных иммунологического обследования в группах детей 2–5 и 6–12 лет наиболее достоверными и схожими были следующие изменения:

- ▶ снижение показателей общего количества лимфоцитов, CD4, ИРИ;
- ▶ повышение доли и абсолютного количества CD8, CD25, НК-клеток;
- ▶ снижение ИФ α , повышение сывороточного ИФ и их достоверная динамика в сторону нормализации после иммуотропного лечения.

ВЫВОДЫ

У обследованных нами детей с ПВИ АГО наблюдались транзиторные изменения иммунитета, обусловленные частыми респираторными вирусными инфекциями, хроническими заболеваниями, а также инфицированием ВПЧ, характеризующиеся несостоятельностью Th1/Th2 иммунной регуляции, недостаточной выработкой специфических интерферонов. Очевидно, основным фактором иммунной

недостаточности у данного контингента больных была высокая степень генетической идентичности присутствующих типов вирусов и эпителиоцитов.

У больных исследуемой группы не наблюдалось классических местных проявлений хронического воспаления. Возможно, в данном случае очаговые пролиферативные разрастания эпителия кожи и слизистых – альтернативный вариант воспаления, что может быть следствием геномной нестабильности эпителиоцитов, инфицированных ВПЧ, а также интеграцией ДНК ВПЧ в молекулы главного комплекса гистосовместимости антигенпрезентирующих клеток хозяина-носителя вирусов. Необходимы дальнейшие исследования по созданию эффективных средств направленного иммуотропного действия для лечения больных с ПВИ АГО.

Литература

1. Konya J., Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res* 2001; 82: 205–38.
2. Bouwes Bavinck J.N., Felthamp M., Struijk L., Schegget J. Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001; 6: 207–11.
3. Mbulaitye S.M., Biggar R.J., Goedert J.J., Engels E.A. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32: 527–33.
4. Mosmann T.R., Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138–46.
5. Nakagawa M., Stites D.P., Patel S., et al. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis* 2000; 182: 595–8.
6. Carter J.J., Koutsky L.A., Hughes J.P., Lee S.K., Kuypers J., Kiviat N., Galloway D.A. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis* 2000; 181: 1911–9.
7. Ho G.Y.F., Studentsov Y.Y., Bierman R., Burk R.D. Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 110–6.
8. Stern P.L., Brown M., Stacey S.N., Kitchener H.C., Hampson I., Abdel-Hady E.-S., Moore J.V. Natural HPV immunity and vaccination strategies. *J Clin Virol* 2000; 19: 57–66.
9. Melief C.J.M., van Der Burg S.H., Toes R.E.M., Ossendorp F., Offringa R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev* 2002; 188: 177–82.
10. Коколина В.Ф., Румянцев А.Г. Практическое руководство по детским болезням. Т. 8. Иммунология детского возраста (Под ред. А.Ю. Щербины, Е.Д. Пашанова). – М.: Медпрактика-М, 2006, с. 432.

Рисунок 4

Динамика интерферонов статуса и иммуноглобулинов А, М, G до и после лечения у детей 6–12 лет

