

## ВЛИЯНИЕ «АЛЛОКИНА-АЛЬФА» НА ЭКСПРЕССИЮ МАРКЕРОВ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ T<sub>reg</sub> У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

© 2009 П.И. Ковчур<sup>1</sup>, Е.К. Олейник<sup>2</sup>, И.Е. Бахлаев<sup>1</sup>, А.В. Чуров<sup>2</sup>, В.М. Олейник<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Петрозаводский государственный университет

<sup>2</sup> Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск

Работа посвящена определению клинической эффективности препарата «Аллокин-альфа» при лечении женщин с заболеваниями шейки матки, инфицированных папилломавирусом (ВПЧ). В динамике изучено состояние иммунной супрессии у больных с хронической ВПЧ при комплексном лечении с «Аллокином-альфа». Для оценки функционального состояния регуляторных лимфоцитов определяли уровень экспрессии гена трансформирующего фактора роста-β 1 (TGF-β1), а также уровень экспрессии гена транскрипционного фактора FOXP3. Клиническая эффективность комплексного лечения ВПЧ-инфекции с применением «Аллокина-альфа» в сочетании с различными заболеваниями шейки матки составила 91,9%. Показано, что у больных с хронической ВПЧ-инфекцией наблюдается повышенный уровень иммунной супрессии, что не позволяет эффективно подавлять размножение вируса. При комплексной терапии больных, инфицированных ВПЧ, применение препарата «Аллокин-альфа» вызывает снижение экспрессии гена ингибирующего цитокина TGF-β1, что представляет собой реальную возможность использования «Аллокина-альфа» для иммунной модуляции на уровне регуляторных лимфоцитов с целью усиления противовирусного иммунного ответа.

Ключевые слова: *маркер, лимфоцит, папилломавирусная инфекция*

Основным этиологическим фактором возникновения рака шейки матки (РШМ) у женщин является персистирующая папилломавирусная (ВПЧ) инфекция человека [5]. Используя различные механизмы молекулярной мимикрии, подавления активности иммунокомпетентных клеток, ВПЧ обеспечивают защиту зараженных ими эпителиальных клеток от уничтожения Т-лимфоцитами и естественными киллерами, беспрепятственную репликацию вирусного генома и инфицирование новых клеток-хозяев [3]. В настоящее время не существует препаратов, избирательно воздействующих на вирус папилломы человека. Несмотря на увеличение арсенала противовирусных препаратов, лечение ВПЧ-инфекции остается сложной задачей [2, 6]. «Аллокин-альфа» новое противовирусное средство – олигопептид, по фармакологическому действию близок к интерферону-альфа и является активатором системы естественных клеток-киллеров [3].

**Цель исследования:** определить клиническую эффективность препарата «Аллокин-альфа» при лечении инфицированных ВПЧ женщин с заболеваниями шейки матки. Изучить влияние комплексной терапии с применением препарата «Аллокин-альфа» на уровень экспрессии молекулярных маркеров регуляторных лимфоцитов периферической крови у больных с хронической ВПЧ-инфекцией.

**Материал и методы исследования.** Комплексно обследовано 99 больных с хронической ВПЧ-инфекцией. В диагностике использована кольпоскопия, цитологическое, гистологическое исследования, определение инфекций передаваемых половым путем, ВПЧ-инфекции с помощью полимеразной цепной реакции. При выявлении 16, 18, 31, 33 типов в сочетании с субклиническими и клиническими проявлениями ВПЧ-инфекции на шейке матки проведено лечение «Аллокином-альфа» (трехкратное введение по 1 мг через день, подкожно). Выделены группы исследования: 1 (n=72) – пациенты с осложненными фоновыми заболеваниями с аномальными кольпоскопическими образованиями; 2 (n=27) – пациенты с дисплазиями шейки матки. Оценивали клиническую эффективность «Аллокина-альфа» с помощью ПЦР-контроля через 3, 6 месяцев от начала лечения. В динамике было изучено состояние иммунной супрессии у 14 больных с хронической ВПЧ-инфекцией с применением препарата «Аллокин-альфа», контрольную группу составили 12 здоровых лиц без ВПЧ-инфекции и заболеваний шейки матки. Выделены 2 подгруппы: 1 (n=6) –

*Ковчур Павел Иванович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры госпитальной хирургии. E-mail: rkovchur@mail.ru*

*Олейник Евгения Константиновна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник E-mail: ole@krc.karelia.ru*

*Бахлаев Иван Егорович, доктор медицинских наук, кафедра госпитальной хирургии E-mail: bie@sampro.ru*  
*Чуров Алексей Викторович, аспирант. E-mail: achugou@yandex.ru*

*Олейник Виктор Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: ole@krc.karelia.ru*

пациенты, где проведена ликвидация очага ВПЧ-инфекции на шейке матки и затем вводился «Аллокин-альфа», 2 (n=8) – «Аллокин-альфа» без ликвидации очага хронической ВПЧ инфекции.

Для оценки функционального состояния регуляторных лимфоцитов ( $T_{reg}$ ) определяли уровень экспрессии гена трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ 1), а также уровень экспрессии гена транскрипционного фактора FOXP3 в лимфоцитах периферической крови. Уровень экспрессии генов TGF- $\beta$ 1 и FOXP3 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией (Real-Time RT-PCR) [4]. Достоверность различий оценивали на основании критерия Манна-Уитни при  $p \leq 0,05$ . На рисунках результаты представлены в виде средних с учетом стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ).

**Результаты и обсуждение работы.** При обследовании у 99 пациенток выявлена ВПЧ-инфекция по результатам ПЦР диагностики. Тип 16 у 69,7% женщин, тип 18 – у 6,1%, тип 33 – у 12,1%, тип 31 – у 7,1%, тип 31+33 – у 2% и тип 74 – 3%. Максимальная распространенность ВПЧ-инфекции у женщин отмечается в возрасте 20-29 лет в обеих группах. Средний возраст пациенток составил 23,4 года (от 18 до 51 года). Возраст начала половой жизни у женщин в группе исследования составил  $17,8 \pm 2,1$  года. Из них 18,2% женщин вступали в половые контакты до 16 лет. Основными жалобами больных (n=99) были зуд (31,5%), жжение в области наружных половых органов (21,8%), умеренные выделения из влагалища (66,4%), отсутствовали жалобы у 11,6% женщин. При обследовании на ИППП и неспецифические заболевания инфекционной патологии выявлены: кандидоз – 14,1%, уреаплазмоз – 24,2%, микоплазмоз – 6,1%, хламидиоз – 11,1%, бактериальный вагиноз – 18,2%, генитальный герпес – 6,1%, трихомониаз – 3%, гонорея – 1%. На предварительном этапе больным с учетом данных обследования проведена комплексная противовоспалительная терапия. Нами на фоне проведения противовирусной терапии препаратом «Аллокин-альфа» в 86,9% случаях ВПЧ-инфекции (n=99) выполнялась деструкция патологических процессов на шейке матки. В 13,1% случаев проводилось только лечение «Аллокином-альфа» с последующим кольпоскопическим, цитологическим и ВПЧ-контролем в динамике на протяжении 1, 3, 6 месяцев. Применялись схемы комплексного лечения заболеваний шейки матки в сочетании с ВПЧ-инфекцией: Схема 1 (Аллокин-альфа + диатермоэксцизия шейки матки); Схема 2 (Аллокин-альфа + криодеструкция шейки матки); Схема 3 (Аллокин-альфа + обработка

солковагином + солкодермом); Схема 4 (Аллокин-альфа + лазеровапоризация); Схема 5 (Аллокин-альфа без местного лечения шейки матки).

Наблюдением за больными, получавшими препарат «Аллокин-альфа» в течение 1, 3 месяцев установлено, что у 89,9% отсутствовала ВПЧ-инфекция по данным ПЦР-контроля, цитологического и кольпоскопического исследований. В 1 группе (n=72) у пациентов отсутствие ВПЧ-инфекции по данным ПЦР-контроля, цитологического и кольпоскопического исследований отмечено в 87,5% случаев. Применялись схемы 1 (n=27), схемы 2 (n=17), схемы 3 (n=8), схемы 4 (n=9), схемы 5 (n=11). В 6 случаях отмечена ВПЧ-инфекция в клинически малозначимых концентрациях вируса (менее 3lg на  $10^5$  клеток), в остальных (3) случаях – ВПЧ-инфекция не выявлена. Во 2 группе (n=27) отсутствие ВПЧ-инфекции отмечено в 92,6% случаев. Результат достигнут применением схемы 1 (n=15), схемы 2 (n=6), схемы 4 (n=4), схемы 5 (n=2). В 1 случае выявлена ВПЧ-инфекция менее 3lg на  $10^5$  клеток, во втором – более 5lg на  $10^5$  клеток через 6 месяцев от начала лечения, что потребовало дополнительного лечения. Таким образом, клиническая эффективность комплексного лечения ВПЧ-инфекции с «Аллокином-альфа» в сочетании с различными заболеваниями шейки матки у женщин составила 91,9%.

При изучении функционального состояния  $T_{reg}$ -клеток до начала лечения «Аллокином-альфа» и после лечения у больных установлена повышенная функциональная активность  $T_{reg}$ -лимфоцитов. Уровень экспрессии TGF- $\beta$ 1 был значительно выше у больных в сравнении со здоровыми лицами ( $1,30 \pm 0,13$  и  $1,00 \pm 0,08$  соответственно,  $p < 0,05$ ), а также повышение уровня экспрессии гена FOXP3 ( $1,25 \pm 0,12$  и  $1,00 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ). Данный факт свидетельствует об активации регуляторных лимфоцитов-супрессоров с фенотипом  $CD4^+FOXP3^+$ . При этом динамика уровня экспрессии TGF- $\beta$ 1 и FOXP3 зависела от группы больных. В 1 группе отмечено снижение уровня TGF- $\beta$ 1 (рис. 1) после терапии препаратом «Аллокин-альфа» ( $1,89 \pm 0,20$  и  $1,48 \pm 0,30$  соответственно).

Известно, что препарат оказывает стимулирующее воздействие на активность NK-клеток, усиливая синтез интерферонов при генитальном герпесе [1]. Возможно, таков механизм действия препарата «Аллокин-альфа» на неспецифический иммунитет, что делает его схожим с рядом других препаратов, оказывающих общий противовирусный эффект. Более интересным представляется вопрос о возможном влиянии препарата на специфический иммунитет. Наши результаты показали, что исходно до начала применения

аллокина-альфа, носители хронической ВПЧ-инфекции характеризуются своеобразным состоянием иммунной супрессии, которая не позволяет эффективно подавлять репликацию вируса. Это состояние обеспечивается субпопуляциями специфических к антигену регуляторных лимфоцитов-супрессоров, которые подавляют развитие иммунного ответа на вирус папилломы, в том числе выделяя цитокины-ингибиторы. Препарат «Аллокин-альфа» может оказывать влияние на регуляторные клетки опосредованно через цитокиновую сеть,

нарушая баланс в сторону усиления синтеза цитокинов-стимуляторов клеточного иммунитета. Такую тенденцию к снижению уровня экспрессии супрессорного цитокина TGF- $\beta$ 1 мы отмечаем для больных в группе 1. Во второй группе заметных изменений в уровне экспрессии TGF- $\beta$ 1 и FOXP3 не отмечено, но в этой группе не проводилось одновременно с применением «Аллокина-альфа» дополнительное лечение шейки матки с помощью различных инвазивных методов.

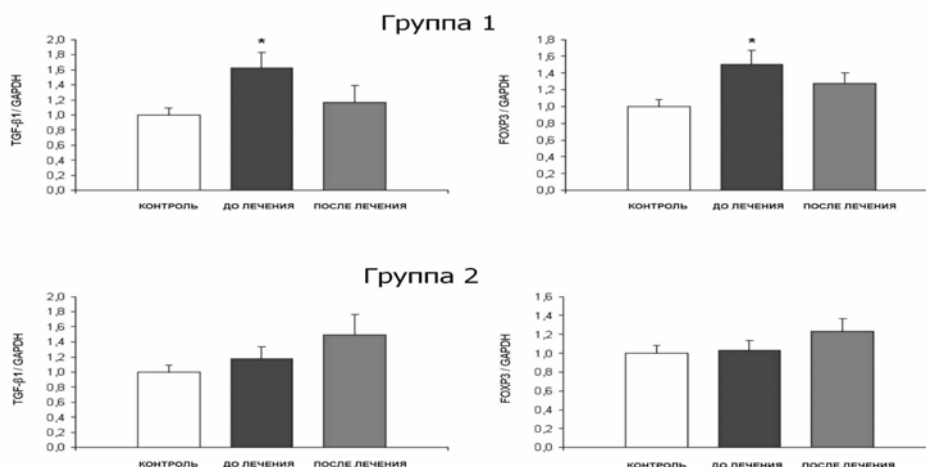


Рис. 1. Уровень экспрессии генов TGF- $\beta$ 1 и FOXP3 в лимфоцитах периферической крови у пациентов с ВПЧ инфекцией до и после лечения «Аллокином-альфа»

**Выводы:** у больных с хронической ВПЧ-инфекцией устанавливается определенный уровень иммунной супрессии, не позволяющий эффективно подавлять размножение вируса, что проявляется в повышенной экспрессии молекулярных маркеров регуляторных лимфоцитов-супрессоров. Применение «Аллокина-альфа» вызывает снижение экспрессии гена цитокина-ингибитора в группе 1, что позволяет предполагать, что «Аллокин-альфа» может быть использован для иммунной модуляции на уровне регуляторных лимфоцитов с целью усиления противовирусного иммунного ответа. Результаты комплексного лечения заболеваний шейки матки с применением «Аллокина-альфа» показали, что противовирусное лечение должно проводиться обязательно, так как персистенция ВПЧ-инфекции является ключевым фактором развития заболевания. В то же время клиническая эффективность применения препарата значительно повышается при комплексном подходе к лечению больных, при сочетании противовирусного влияния аллокина-альфа с традиционными методами лечения заболеваний шейки матки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Ершов, Ф.И.* Влияние терапии «аллокином-альфа» на течение рецидивов хронического генитального герпеса / *Ф.И. Ершов, А.А. Кубанова, Б.В. Пинегин* и др. // Деловые партнеры – 2003. - №4 (40). – С. 103-111.
2. *Киселев, В.И.* Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и профилактики. / *В.И. Киселев, Л.А. Ашрафян, С.О. Бударина* // Гинекология. – 2004. – Т. 6. – №4. – С. 174-179.
3. *Черныш, С.И.* Аллокины (цитокноподобные пептиды насекомых) как модуляторы иммунного ответа человека и других млекопитающих // Russian Journal of Immunology. – 2004. – V. 9, S. 1. – P. 36.
4. *Bustin, S.A.* Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems // J. Mol. Endocrinol. – 2002. – V. 29. – P. 23-39.
5. *Einstein, M.H.* Human papillomavirus and cervical neoplasia. / *M.H. Einstein, G.L. Goldberg* // Cancer Invest. – 2002. – V. 20. – P. 1080-1085.
6. *Khleif, S.* Targeting human papillomavirus for cancer prevention and therapy. – NCI, ASCO. Educating book. – 2007. – P. 334-337.

INFLUENCE OF "ALLOKIN-ALPHA" ON EXPRESION OF REGULATING  
LYMPHOCYTE T<sub>reg</sub> MARKERS IN PATIENTS WITH CHRONICAL  
PAPILLOMAVIRUS INFECTION

© 2009 P.I. Kovchur<sup>1</sup>, E.K. Oleinik<sup>2</sup>, I.E. Bahlaev<sup>1</sup>, A.V. Churov<sup>2</sup>, V.M. Oleinik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Petrozavodsk State University

Institute for Biology Karelian Science Centre RAS, Petrozavodsk

This research devoted to determination of the clinical efficiency of preparation «Allokin-alpha» in the therapy of cervix uteri diseases associated with human papillomavirus (HPV). The article presents data of the complex examination of 99 patients with chronicle HPV-infection. Condition of immune suppression of 14 patients with chronicle HPV-infection was studied in dynamics in complex treatment with «Allokin-alpha». Level of the expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) gene and transcription factor FOXP3 gene were determined for estimation of function condition of regulating lymphocyte (T<sub>reg</sub>). Clinical efficiency of complex treatment HPV-infection associated with different cervix uteri diseases using «Allokin-alpha» was 91.9%. It was found that patients with chronicle HPV-infection characterized with certain level of immune suppression which doesn't allow effective suppress of the reproduction of the virus and manifests in increased expression of molecular markers of regulating lymphocyte-suppressors. In complex therapy patients with HPV-infection using preparation «Allokin-alpha» courses decrease of expression of inhibition cytokine TGF- $\beta$ 1 gene and that performed the real opportunity using «Allokin-alpha» for immune modulating on the level of regulating lymphocyte for increasing antivirus immune reply.

Key words: *marker, lymphocyte, papillomavirus infection*

*Pavel Kovchur, Candidate of Medicine, Assistant at the Clinical Surgery Department. E-mail: pkovchur@mail.ru*

*Evgeniya Oleinik, Doctor of Biology, Main Research Fellow  
E-mail: ole@krc.karelia.ru*

*Ivan Bakhlaev, Doctor of Medicine, Clinical Surgery Department.  
E-mail: bie@sampo.ru*

*Aleksey Churov, Graduate Student. E-mail: achurov@yandex.ru*

*Viktor Oleinik, Doctor of Biology, Chief Research Fellow.  
E-mail: ole@krc.karelia.ru*