

Применение кавитированных растворов пептидных регуляторов иммунитета при CIN I

Кононова И.Н., к.м.н., доцент, с.н.с., руководитель Учебного центра ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ

Обоскалова Т.А., д.м.н., доцент, зав. кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «УГМУ» МЗ РФ

Несмотря на достигнутые успехи в лечении заболеваний шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, наблюдается значительный рост предраковой и раковой патологии.

В России традиционно распространенным способом ведения пациенток с предраковыми заболеваниями шейки матки, ассоциированными с папилломавирусной инфекцией, продолжает оставаться деструкция очага (криотерапия, электрокоагуляция, лазеровапоризация и др.). Между тем изменения местного иммунитета, вызванные онкобелком E7, экспрессирующимся высокоонкогенными типами ВПЧ при переходе вируса в стадию интегративной инфекции, приводят к развитию дисбиотических процессов в половых путях, в свою очередь способствующих реализации папилломавирусных инфекций, вызывают трудности лечения. Имеющиеся результаты применения противовирусных и иммуномодулирующих препаратов свидетельствуют о снижении рецидивирования предракового процесса лишь на 35-56%, элиминация ВПЧ – в 47-75% случаев.

Учитывая свойства иммунорегуляторного пептида Имунофана и эффекты при воздействии низкочастотного ультразвука на биологические ткани, его фонофоретические возможности, на кафедре акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России разработан метод комплексного лечения цервикальных интраэпителиальных неоплазий I степени, включающий назначение иммуномодулирующего регуляторного пептида Имунофан, кавитированного и введенного интравагинально []. Посредством влияния на образование в цитоплазме вторичных мессенжеров и последующего усиления сигнала регуляторные пептиды в диапазоне низких доз вызывают адекватное изменение функциональной активности клеток в зависимости от их исходного состояния. При этом сниженные показатели увеличиваются, а гиперактивные процессы возвращаются до значений близких к физиологическому уровню. Воздействие Имунофана приводит к коррекции иммунной и окислительно-антиокислительной систем защиты организма. По имеющимся в литературе данным, эффективность медикаментозных средств повышается при использовании ультразвукового кавитирования, позволяющего транспортировать препарат в глубину тканей.

Для решения вопроса о применении кавитированных растворов пептидных регуляторов иммунитета при лечении CIN проведено экспериментальное исследование стабильности гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина при воздействии ультразвуковыми волнами в низкочастотном диапазоне (25 кГц) в лаборатории кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В.Сергеева ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова. После «озвучивания» раствор гексапептида был подвергнут

изучению на сохранение целостности структуры пептидного регулятора иммунитета с помощью электрофореза в инертном носителе. В качестве маркеров использовались моно-, ди- и три-пептиды – продукты гидролиза Имунофана. Для выявления изменений Имунофана под действием ультразвука была выбрана масс-спектрометрия MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight). Этот метод позволял определять молекулярные массы пептидов, в том числе фрагментов исходного пептида, если таковые могли образовываться при воздействии ультразвуком на исходный препарат. Масс-спектры были зарегистрированы на MALDI-TOF масс-спектрометре Bruker Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, ФРГ), оснащенный лазером с активной средой из алюмоиттриевого граната («YAG», Y3Al5O12) легированного ионами неодима (Nd). Спектры, зарегистрированные в рамках представленной работы, получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Как следует из зарегистрированных масс-спектров, пептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валилтирозил-аргинин, являющийся действующим веществом препарата Имунофан, присутствовал в образце до воздействия ультразвуком, и после воздействия ультразвука с максимальной мощностью и максимальной продолжительностью, что свидетельствовало об устойчивости препарата к воздействию низкочастотного ультразвука.

Описание метода лечения CIN I кавитированным раствором Имунофана

Процедура проводится в кабинете гинеколога или манипуляционной. Пациентка располагается на гинекологическом кресле. Влагалище и шейка матки обнажаются в зеркалах. Анестезии не требуется. Для данной манипуляции используется акустический узел АА 108, в комплект которого входят ультразвуковой инструмент с ирригационным каналом и сменный защитный кожух. Акустический узел, инструмент, защитный кожух и ключ для фиксации инструмента должны быть подвергнуты стерилизации. Акустический узел подключается к разъему на передней панели блока управления.

На акустический узел стерильным ключом в стерильных перчатках прикручивается стерильный инструмент. Далее стерильный защитный кожух надевается на ультразвуковой инструмент и фиксируется к акустическому узлу (использование защитного кожуха предохраняет ткани от случайного касания активированным ультразвуковым инструментом и позволяет безопасно проводить процедуру ультразвуковой обработки шейки матки). Затем к штуцеру внутреннего ирригационного канала акустического узла присоединяется система для внутривенной инфузии или локальная ирригационная система. Блок управления включается с помощью кнопки на передней панели. Регулятором «УРОВЕНЬ» выбирается мощность 6-10 единиц и устанавливается необходимый расход лекарственного раствора.

Берется 5 мкг/мл – 1 мл раствора Имунофана (1 ампула), разводится в 50 мл физиологического раствора перед применением. Когда раствор заполнил систему и начинает поступать через ирригационное отверстие в рабочем инструменте, необходимо активизировать режим работы аппарата «ОСНОВ» посредством нажатия на желтую клавишу педали. Если в результате всех вышеуказанных манипуляций струя

лекарственного раствора, проходящая через ирригационный канал инструмента, превращается в направленное мелкодисперсное облако – то аппарат работает исправно. Перед тем как вводить инструмент во влагалище, необходимо провести тест на распыление во внешней среде в течение нескольких секунд.

После теста на распыление инструмент вводится во влагалище, подается раствор антисептика, активируются ультразвуковые колебания и проводится ультразвуковая обработка шейки матки кавитированным раствором в течение 2-5 минут.

Через каждую минуту аппарат автоматически отключается для удобства подсчета времени воздействия. Чтобы возобновить работу аппарата, необходимо повторно нажать на педаль. После проведения процедуры акустический узел извлекается из влагалища, защитный кожух снимается и помещается в контейнер для дезинфекции и последующей стерилизации.

В процессе проведения процедуры отработанная жидкость пассивно вытекает из влагалища, однако для ускорения эвакуации отработанного лекарственного раствора из полости влагалища может быть использован аспиратор жидкости ФОТЕК А001, работающий синхронно с ультразвуковым аппаратом. Аспирация будет включаться при нажатии желтой клавиши педали ультразвукового аппарата. Удаление раствора из влагалища при использовании аспиратора осуществляется с помощью специально разработанных многоразовых или одноразовых аспирационных наконечников.

Мелкодисперсное распыление раствора с Имунофаном, производится при мощности 6-7 единиц и расходе жидкости 1-2 капли в секунду № 5. Воздействие озвученным раствором с Имунофаном приводит к импрегнации иммунотропного препарата в глубокие слои тканей (до 9мм) с созданием в них депо лекарственного вещества. При этом обеспечивается противовирусный эффект, иммуномодулирующий, бактерицидный эффект, антиоксидантный, а также стимуляция регенерации тканей.

При выявлении сопутствующего вагинита перед проведением процедуры с Имунофаном дополнительно проводятся процедуры с антисептиком (водный раствор хлоргексидина 0,05%; раствор Бетадина в разведении 1:20 со стерильным раствором хлорида натрия; водный раствор фурацилина 0,02% (1:5000); раствор хлорида натрия 0,9%). Для очищения слизистой шейки матки и влагалища от инфицированных выделений выбирается мощность в диапазоне 7-10 единиц и устанавливается максимальный расход антисептика. Воздействие озвученным раствором антисептика приводит к качественной очистке слизистой влагалища от гноя, экстракции патологического содержимого, а также к импрегнации лекарственного раствора в глубокие слои тканей с созданием в них депо лекарственных веществ с обеспечением бактерицидного эффекта.

Эффективность данной методики была оценена во время клинического, лабораторного обследования и лечения 96 пациенток в возрасте от 18 до 45 лет с цервикальной интраэпителиальной неоплазией шейки матки I-II степени, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией. Для изучения местного иммунитета влагалища были

определены уровни sIgA, IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, α TNF, VEGF, IFN α АИТ АТ перед назначением иммуномодулирующей терапии до и после проведения лечения.

До лечения у пациенток с CIN определялась выраженная провоспалительная реакция влагалищной среды и снижение иммунной защиты, что выражалось повышением уровней IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, α TNF, sIgA и снижением показателей IL-4 и IL-10. Значительное увеличение показателя фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) у пациенток с CIN указывало на активацию неоангиогенеза и блокаду эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Значимо высокий показатель антител к интерферону альфа свидетельствовал об активации аутоиммунного процесса в эндотелиальных клетках цервикального канала.

Поскольку интерфероны активируют нейтрофилы и микробо- и опухолюцидное действие макрофагов, стимулируют цитолитическую активность НК, то их полная нормализация после лечения указывала на положительное воздействие Имунофана на локальный иммунитет влагалища, тогда как после «чистой» деструкции сохранялись существенные отклонения от нормы, а воздействие только низкочастотным ультразвуком или только введением внутримышечно Имунофана вызывало незначительное улучшение параметров интерферонового статуса.

Значения аутоиммунных антител к интерферону альфа (IFN α АИТ АТ) как после комплексного воздействия низкочастотного ультразвука и кавитированного раствора с Имунофаном, так и после изолированного применения данных методов терапии свидетельствовало о нормализующем влиянии данных методов на аутоиммунные комплексы.

IL-1 β , являющийся медиатором воспалительного ответа, модулятором белков острой фазы, после интравагинального применения Имунофана значительно снижался. Между тем деструкция шейки матки без использования Имунофана приводила к активации воспалительных реакций. Поскольку IL-6 и IL-1 β являются регуляторами воспаления и иммунного ответа на инфекцию или повреждение ткани, применение Имунофана с ультразвуком, нормализующие данные параметры, патогенетически оправдано.

Уменьшение повышенных значений самого раннего провоспалительного цитокина IL-8 после лечения свидетельствовало о нормализации провоспалительного ответа в процессе стимуляции и дегрануляции лейкоцитов, снижении ангиогенеза, уменьшению миграции фагоцитов в очаг воспаления и синтеза молекул адгезии. Повышение данного показателя после деструкции свидетельствовало о выраженном воспалительном ответе в зоне ожога.

Снижение увеличенных параметров IL-4 и IL-10, ингибирующих иммунный ответ, до нормальных значений, свидетельствовало о нормализующем влиянии кавитированных растворов пептидных регуляторов иммунитета на данные цитокины. Выраженное снижение противовоспалительных интерлейкинов после «чистой» деструкции являлось показателем чрезмерного угнетения иммунного ответа, что сохраняло риски постдеструктивных патологических процессов.

Нормализующее действие оказало влияние кавитированного иммунофана, введенного интравагинально, на фактор роста эндотелия сосудов.

Промежуточный визит для оценки эффективности проводимой терапии осуществлялся через 30, 60 и 90 дней, когда проводилась расширенная кольпоскопия с целью оценки эффективности проведенного лечения и реабилитации. После применения интравагинального кавитированного раствора Иммунофана у 84,6% пациенток с цервикальными неоплазиями наблюдался оригинальный сквамозный эпителий, не требующий дальнейшей деструктивной терапии. Проведенное у данных пациенток обследование на ВПЧ через 3 месяца в 76,9% случаев выявило отрицательный результат. Оригинальный сквамозный эпителий был выявлен у 69,2% пациенток после применения УЗ через 30 дней, в 3-й группе данные показатели составили 65,4%; в 4-й группе – у 75,0% пациенток. При динамическом обследовании у 7 пациенток без применения кавитированного раствора иммунофана повторно обнаружена картина CIN 1 соответственно, что явилось показанием для повторной деструкции. При контрольном обследовании через 1 месяц установлено полное выздоровление.

Таким образом, при изучении локального иммунитета влагалища установлено, что цервикальные неоплазии I степени, ассоциированные с папилломавирусной инфекцией, сопровождаются выраженными иммунными дисфункциями, способствующими рецидивированию процесса. Деструктивные методы лечения, устраняя морфологический субстрат патологии, не влияют или даже ухудшают иммунную реакцию влагалищной среды, что замедляет процессы репарации и сохраняет вероятность рецидивов интраэпителиальных неоплазий. Введение в комплексную терапию локального применения иммуномодулирующего препарата Иммунофан способствует нормализации показателей местного иммунитета. Большое значение имеет и способ доставки лекарственного средства к патологическому очагу. Ультразвуковая кавитация лечебного раствора не только обеспечивает мелкодисперсное распыление препарата, способствующее проникновению в межклеточные пространства вагинального и цервикального эпителия, фонофорез препарата на глубину 8мм, но и обладает прямым бактерицидным действием, разрушая мембрану микробных агентов. Одновременно с этим обеспечивается высокоамплитудный массаж тканей влагалища гидродинамическими потоками, инициируемыми акустическими течениями в промежуточном лекарственном растворе, а также усиление массообмена в прилежащих к влагалищу кровеносной и лимфатической системах органов и систем малого таза. Выявленные терапевтические эффекты: улучшение показателей местного иммунитета, ускорение репаративных процессов на шейке матки, элиминация ВПЧ, позволяют рекомендовать интравагинальное введение кавитированного раствора Иммунофана для лечения цервикальных неоплазий I степени, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией.

Преимущества комплексного применения кавитированного раствора с Иммунофаном и низкочастотного ультразвука по сравнению с традиционными методами лечения:

- сокращение сроков лечения;
- относительная простота реализации методик;
- минимальная затрата времени на проведение процедур;
- снижение медикаментозной нагрузки на пациентку;
- уменьшение осложнений и последствий;
- уменьшение рецидивирования предракового процесса.

Апробированная технология с применением кавитированных низкочастотным ультразвуком растворов пептидных регуляторов иммунитета позволяет оптимизировать лечение, избежать развития постдеструктивных патологических процессов, сохранить анатомическую целостность шейки матки для дальнейшего выполнения репродуктивной функции.

Список литературы

1. Аксель Е.М. Заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы в России. Онкогинекология. 2015. №1. С. 6-15
2. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии. Под ред. В.Е. Радзинского. М.:ГЭОТАР-Медиа, 2016. 1136с.
3. Заболевания шейки матки и генитальные инфекции. Под ред. В.Н. Прилепской. Москва.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 384с.
4. Абрамовских О.С., Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф. Иммунологические критерии прогноза течения цервикальной патологии, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015. № 3. С.8-13
5. Минкина Г.Н., Манухин М.В., Гаврикова И.Б. Диагностика остаточных / рецидивных предраковых заболеваний шейки матки после электроэксцизии. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, 2009. Т.8, №5. С. 23-27
6. Шейка матки, влагалище, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей. Под ред. С.И.Роговской, Е.В.Липовой. М.: изд-во журнала StatusPraesens, 2014. 832с.
7. Кононова И.Н., Обоскалова Т.А., Ворошилина Е.С. Глухов Е.Ю. Патент на изобретение № 2565846 Российской Федерации: «Способ лечения ВПЧ-ассоциированных CIN I с использованием кавитированного раствора иммунофана» 23.09.2015г.

8. Кононова И.Н. Эффективность терапии папилломавирусной инфекции с использованием кавитированных растворов пептидных регуляторов иммунитета у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями / И.Н.Кононова, Т.А.Обоскалова, Е.С.Ворошилина // Российский иммунологический журнал. – 2014. - Т.8(17). – №3 – С.699-701.
9. Кононова И.Н. Иммунологические и молекулярно-генетические параллели при ВПЧ-ассоциированных CIN, способы коррекции / И.Н. Кононова, Е.С. Ворошилина // Аллергология и иммунология. – Том 15. -№4. - 2014. – С. 298.
10. Кононова И.Н. Влияние ультразвука низкочастотного диапазона на стабильность пептидного регулятора иммунитета (гексапептида иммунофана) в эксперименте / И.Н. Кононова, Е.В. Хряпова, И.Ю. Торопыгин, Д.А. Тихонов, Т.А. Обоскалова, К.С. Назаров, С.Л. Локшин // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». Фундаментальные исследования . – 2015. – Vol. 17. - № 4. – С. 13 – 18.
11. Кононова И.Н. Комплексная терапия патологии шейки матки, ассоциированной с папилломавирусной инфекцией, с использованием кавитированных растворов пептидных регуляторов иммунитета: учебно-методическое пособие для врачей / И.Н. Кононова, Т.А. Обоскалова, Екатеринбург: ГБОУ ВПО УГМУ, 2014. – 54с.
12. Serena T., Lee S.K., Lam K. The impact of noncontact, non thermal, low-frequency ultrasound on bacterial counts in experimental and chronic wounds. *Ostomy Wound Manage.* 2009, Jan. Vol. 55(1). P. 22-30.).