

**КОВАЛЕВ МИХАИЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ИММУННЫЕ ФАКТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭКССУДАТИВНЫХ  
ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ И ОБОСНОВАНИЕ  
ПРИМЕНЕНИЯ ТОПИЧЕСКОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ В РАННЕМ  
ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**

3.2.7. Иммунология

3.3.3. Патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук.

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор,  
Заслуженный деятель науки РФ

**Зурочка Александр  
Владимирович**

доктор медицинских наук, доцент

**Давыдова  
Евгения Валерьевна**

**Официальные оппоненты:**

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,  
профессор, профессор кафедры микробиологии,  
вирусологии и иммунологии им. академика  
А.А. Воробьева ФГБОУ ВО «Первый Московский  
государственный медицинский университет им.  
И.М. Сеченова» Минздрава России, директор ФГБНУ  
«НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

**Свитич  
Оксана Анатольевна**

доктор медицинских наук, профессор, заведующая  
кафедрой нормальной и патологической физиологии  
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный  
медицинский университет» Минздрава России

**Маркелова  
Елена Владимировна**

**Ведущая организация** – ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России (г. Пермь).

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620041, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01  
к.б.н.

Ю.А. Журавлёва

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.**

Экссудативные поражения пространства Рейнке (ЭППР) голосовых складок относятся к доброкачественной опухолеподобной патологии гортани и составляют, по данным разных авторов, 50–75 % (Дайхес Н.А. и соавт., 2009; Степанова Ю.Е. и соавт., 2018, 2019; Pestana P.M. et al., 2017). Особая медико-социальная значимость ЭППР обусловлена их важным влиянием на профессиональную сферу жизни пациентов, поскольку они чаще наблюдаются у профессионалов голоса (Milovanovic J. et al., 2018).

В структуре ЭППР различают полипы голосовых складок, встречающиеся в 40–69 %, отек Рейнке – в 5–7 % случаев и голосовые узелки (10–24 % случаев) (Василенко Ю.С., 2002; Segal L.N., 2016; Vasconcelos D. et al., 2019). Ключевым этиологическим фактором формирования различных форм ЭППР является постоянное перенапряжение голосового аппарата, часто в сочетании с воздействием химических раздражителей (табачного дыма) (Кунельская Н.Л. и соавт., 2019, 2020; Tan M. et al., 2017).

Общей патогенетической основой ЭППР вне зависимости от клинической формы является повышение проницаемости сосудистой стенки и скопление отечной жидкости в интерстициальной ткани пространства Рейнке в условиях недостаточного отведения лимфы в силу анатомических особенностей лимфатической системы региона гортани (Martins R.H. et al., 2016; Tan M. et al., 2017).

В зоне мукозоассоциированной лимфоидной ткани (МАЛТ) региона гортани, надгортанника, голосовых складок идентифицированы макрофаги, дендритные клетки, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, В-лимфоциты, NK-клетки с экспрессией молекул HLA класса II, а также гранулоциты и эозинофилы, организованные в структурированные клеточные скопления (Barker E. et al., 2006; Debertin A.S. et al., 2006; Rees L. E. et al., 2006; Tonti E. et al., 2009).

Ввиду низкой терапевтической эффективности консервативного лечения, практически все пациенты с ЭППР подвергаются хирургическому удалению новообразований. Возможность развития функциональных и органических осложнений послеоперационного периода, высокая социально-профессиональная значимость патологии, необходимость длительной фonoпедической реабилитации диктуют необходимость поиска актуальных терапевтических подходов к ведению раннего послеоперационного периода.

Недостаточное представление о морфофункциональных особенностях различных форм ЭППР, роли функциональной интеграции иммунного и тканевого гомеостаза, редокс-статуса тканей в формировании новообразований является основным препятствием для дифференциальной диагностики и создания инновационных методов лечения. При этом отсутствие клинических и морфологических признаков острого воспаления при формировании ЭППР связывают с наличием базового уровня провоспалительных цитокинов, характерного для данного биотопа.

Патогенетически обоснованным методом модуляции иммунного и редокс-статуса при ЭППР может выступать озонотерапия, эффективность которой продемонстрирована

в лечении широкого спектра терапевтической и хирургической патологии (Щетинин С.А. и соавт., 2016; Сюдюкова Е. Г. и соавт., 2020; Clavo V. et al., 2018, 2021).

Мультимодальные свойства медицинского озона позволяют прогнозировать положительный терапевтический эффект (Bocsi V., Valacchi G., 2015; Borrelli E., Bocsi V., 2018; Martínez-Sánchez G. et al., 2020).

**Цель исследования** – оценить роль изменений иммунного и тканевого гомеостаза, редокс-статуса в патогенезе экссудативных поражений пространства Рейнке и обосновать применение локальной озонотерапии в раннем послеоперационном периоде.

**Задачи исследования:**

1. Выявить клинические, морфологические и морфометрические особенности разных форм экссудативных поражений пространства Рейнке.

2. Исследовать особенности иммунного гомеостаза тканей различных форм экссудативных поражений пространства Рейнке: субпопуляционный спектр лимфоцитов, маркеры клеточного обновления, цитокиновый профиль тканей.

3. Оценить показатели окислительной модификации липидов и белков в тканях в зависимости от формы экссудативного поражения пространства Рейнке.

4. В динамике исследовать клинические, эндоскопические и акустические параметры, отражающие эффективность топической озонотерапии в раннем послеоперационном периоде после удаления экссудативного поражения пространства Рейнке.

5. Проанализировать динамику уровней про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов в слизистом отделяемом голосовых складок в условиях применения локальной озонотерапии в раннем послеоперационном периоде.

**Научная новизна работы.** Получены новые сведения о морфологических особенностях тканевой структуры различных форм ЭППР, позволяющих отнести полипы миксоидного типа и отек Рейнке к «мягким» новообразованиям, а полипы ангиоматозного типа и голосовые узелки – к «плотным», что расширяет современные представления о механизмах развития невоспалительной продуктивной патологии голосовых складок. Впервые установлены четыре иммунофенотипа ЭППР, показаны изменения тканевого гомеостаза, характеризующиеся более интенсивными процессами ремоделирования в тканях «плотных» новообразований. Впервые документированы особенности изменений цитокинового профиля, маркеров клеточного обновления, тканевого ремоделинга, окислительной модификации липидов и белков в зависимости от формы ЭППР.

Впервые представлены данные о позитивном влиянии локальной озонотерапии на процессы репарации, в виде ускорения редукции воспалительных изменений в ране, улучшения клинико-инструментальных и акустических показателей. Впервые на фоне локальной озонотерапии продемонстрировано ограничивающее влияние озона на процессы окислительной деструкции липидов и белков в виде снижения в слизистом отделяемом голосовых складок содержания первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, ранних и поздних маркеров окислительной

модификации белков, увеличения резервно-адаптационного потенциала; показано снижение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов до показателей здоровых лиц, увеличение содержания регуляторных цитокинов и факторов роста, что отражает интенсивность репаративных процессов.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Результаты исследования расширяют современные представления о роли компонентов врожденного и адаптивного иммунитета МАЛТ региона гортани и голосовых складок, факторах тканевого гомеостаза, изменениях редокс-статуса тканей, обеспечивающих формирование и эволюцию различных форм ЭППР.

В работе представлены и с патогенетических позиций обоснованы данные об эффективности применения локальной озонотерапии в раннем послеоперационном периоде хирургического лечения ЭППР, позволяющей ускорить сроки заживления раны и предупредить развитие осложнений, вне зависимости от формы патологии. Показаны иммуномодулирующий, противовоспалительный, противоболевой, ограничивающий окислительную деструкцию липидов и белков, репаративный эффекты медицинского озона, способствующие ограничению зоны вторичной альтерации, уменьшению выраженности воспалительных изменений, активации репаративных процессов в ране. Представленные в работе данные позволяют обосновать применение локальной озонотерапии в хирургической оториноларингологии и включения вариантов озонотерапии в комплексное лечение патологии лор-органов.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы была спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. Организация исследования одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 3 от 15.03.2019), локальным этическим комитетом ООО «ДокторЛаб» (протокол № 5 от 10.11.2020).

В исследование согласно критериям отбора, включены 72 пациента обоего пола в возрасте от 25 до 55 лет с различными формами ЭППР. Всем пациентам, поступающим на оперативное лечение, выставлялся диагноз по МКБ-10 (J38.1 Полип голосовой складки и гортани). Верификацию различных форм ЭППР проводили на основании данных видеофибrolарингоскопии и гистологического исследования биопсийного материала. Методы исследования включали: клинико-инструментальные, морфологические, биохимические, иммунологические, статистические.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Формирование различных форм экссудативных поражений пространства Рейнке сопровождается характерной клинико-морфологической картиной, изменениями тканевого и иммунного гомеостаза, редокс-статуса тканей.

2. Применение в раннем послеоперационном периоде локальной озонотерапии снижает выраженность воспалительных явлений в ране, ускоряет процессы репарации тканей, улучшает акустические показатели.

3. Механизмы протекторного влияния медицинского озона на ткани включают противовоспалительный, противоболевой, иммуномодулирующий, репаративный, ограничивающий окислительную модификацию липидов и белков эффекты.

#### **Степень достоверности, апробация результатов**

Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений, полноте и широте библиографической справки, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования

Основные положения диссертации представлены на XIV, XV, XVI, XVII Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2019, 2020, 2021, 2022); Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019); I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы» (Самара, 2020); XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (Санкт-Петербург, 2021).

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Разработка основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, постановку цели и задач, разработку дизайна исследования, проводились совместно с научными руководителями. Выбор и обоснование методов исследования, набор, анализ и интерпретация экспериментального материала, поиск и анализ данных научной литературы, статистическая обработка данных, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, написание и оформление рукописи выполнены лично автором. Клинические, акустические, инструментальные исследования, хирургическое удаление новообразований выполнены автором совместно с сотрудниками эндоскопического отделения ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»; лабораторные исследования – при участии сотрудников ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области, кафедры биохимии им. Ф.И. Лифшица ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, научно-исследовательской лаборатории иммунобиотехнологии Научно-образовательного Российско-китайского центра системной патологии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», иммунологической лаборатории ООО «ДокторЛаб» (Челябинск). Автор приносит искреннюю благодарность всем вышеперечисленным коллективам за оказанную помощь в проведении исследований.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования внедрены в практическую работу отделения оториноларингологии филиала № 3 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий (НМИЦ ВМТ) им. А.А. Вишневого» Минобороны России (г. Одинцово); лабораторную и клиническую практику ООО «ДокторЛаб»; научно-исследовательскую

работу лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 9 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, в том числе 2 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных Web of Science, Scopus.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, включающего 225 отечественных и зарубежных источников. Работа содержит 22 таблицы и 24 рисунка (включая 2 схемы).

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Исследование проведено на базе оториноларингологических отделений ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» и филиала № 3 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий им. А.А. Вишневского» Министерства обороны России (г. Одинцово) с 2019 по 2022 год, а также лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) с соблюдением этических принципов, изложенных в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации; в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (приказ Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266).

В исследовании принимали участие 92 человека, из них основную группу (2) составили 72 пациента обоего пола, средний возраст  $40,0 \pm 2,9$  года, с различными формами ЭППР. Все пациенты поступали на оперативное лечение в отделения оториноларингологии. Диагноз при поступлении выставлялся по МКБ-10 (J38.1 Полип голосовой складки и гортани). Верификацию различных форм ЭППР проводили на основании данных видеофибrolарингоскопии и гистологического исследования биопсийного материала: полипы голосовых складок диагностированы у 40 человек (55,56 %), голосовые узелки – у 13 человек (18,06 %), отек Рейнке – у 19 пациентов (26,39 %). Средняя длительность заболевания составляла  $2,5 \pm 0,6$  года. При отборе пациентов критериями исключения являлись: наличие иной патологии лор-органов; подозрение на злокачественный процесс в области исследования или любой иной локализации; заболевания сердца, сосудов, легких, почек, ЖКТ в стадии обострения; иммунодефицитные, аутоиммунные и лимфопролиферативные заболевания; психические заболевания; острые респираторные вирусные заболевания. Контрольную группу (1) составили 20 практически здоровых лиц (8 мужчин и 12 женщин), средний возраст  $42,0 \pm 2,8$  года, без патологии лор-органов. Все группы были сопоставимы по возрастным характеристикам и наличию сопутствующей соматической патологии вне обострения, что отвечает требованиям исследования.

Основными факторами риска развития ЭППР являлись интенсивные и постоянные голосовые нагрузки (n = 58) и курение (n = 54). Профессиональные вредности, связанные с воздействием токсических ирритантов, высокой температуры, пыли, имели этиологическое значение у 12 пациентов; наличие гастроэзофагеальной рефлюксной болезни с высокой кислотообразующей функцией желудка и клинически выраженного гипотиреоза - у 19 % пациентов. Хирургическое удаление новообразований голосовых складок пациентам основной группы выполнялось на 2-е сутки поступления в стационар с помощью фибробронхоскопа Olympus TYPER150 (Япония) с интегрированным CO<sub>2</sub> лазером Lumenis AcuPulseSurgTouch (Израиль) под контролем электронного микроскопа Haag-Streit Surgical Möller Wedel MV-500 (Германия). Под эндотрахеальным наркозом при прямой микроларингоскопии с помощью ларингоскопического клинка (Karl Storz, Германия) и с установлением опорной системы (Karl Storz, Германия) для фиксации клинка визуализировались просвет гортани и полипно измененные голосовые складки. Микроинструментом и CO<sub>2</sub> лазером в режиме повторяющихся импульсов мощностью 4 Вт с интервалом 0,05 с выполнялось продольное рассечение слизистой голосовой складки по классическому методу Hirano (1983) с последующим удалением фрагментов патологически измененных тканей.

Учитывая единую патогенетическую основу данной патологии, все пациенты с ЭППР вне зависимости от гистологической структуры новообразований до начала оперативного лечения были разделены способом простой рандомизации на две равновеликие подгруппы: подгруппу 2а составили пациенты с ЭППР (n = 36), которым начиная со вторых суток после хирургического удаления новообразований проводилась только ингаляционная терапия 0,9 % физиологическим раствором на ультразвуковом ингаляторе «Альбедо ИН7», в подгруппу 2б (n = 36) включили пациентов, которым, помимо стандартной терапии, начиная со второго дня послеоперационного периода проводилась топическая озонотерапия в виде ежедневных эндоларингеальных аппликаций озонированного оливкового масла ОТРИ®6000 с содержанием озонидов не менее 6000 мг O<sub>2</sub> / кг (активные формы кислорода), кислотное число – не более 50 мг КОН/г (свидетельство о государственной регистрации № RU.67.CO.01.001.E.000193.01.12, декларация соответствия № РОСС.RU.ПК08.Д07237, РОСС.RU.ПК08.Д07238, производство ООО «Медозонс», г. Нижний Новгород, Россия).

Технология проведения процедуры: при помощи непрямой ларингоскопии проводилась аппликация озонированного оливкового масла на слизистую оболочку голосовых складок и прилежащих тканей при помощи гортанных вливаний 1 раз в день, ежедневно, на протяжении 7 дней. После проведения процедуры запрещался прием жидкости и пищи в течение одного часа, а также соблюдался строгий голосовой покой. Побочных эффектов после проведения озонотерапии не зарегистрировано ни в одном случае.

Общий перечень проводимых обследований для всех групп пациентов представлен в *таблице 1*. В *таблице 2* представлены методы исследования, используемые в работе.



**Таблица 1 – Перечень исследований, выполняемых в зависимости от группы объектов исследования, и сроки их проведения**

Исследования	Группы исследования		
	Группа 1 Здоровые лица n = 20	Группа 2 – ЭППР, n = 72	
		Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36
Клинический осмотр	Однократно при заборе материала	При поступлении, 2–10-е сутки – ежедневно	
Сбор анамнеза	При включении в исследование	При поступлении в стационар	
Непрямая ларингоскопия (осмотр, забор материала)	Однократно при заборе материала	1-е сутки (до операции), 3, 7, 10-е сутки (после операции)	
Видеофибrolарингоскопия	–	Интраоперационно	
Акустическое исследование голоса	При включении в исследование	1-е сутки (до операции), 3, 7, 10-е сутки (после операции)	
Иммунологические и биохимические исследования	При включении в исследование	Слизистое отделяемое	
		1-е сутки (до операции), 7, 10-е сутки	1-е сутки (до операции), 7, 10-е сутки
Гистологические, морфометрические, иммуногистохимические, иммунологические, биохимические	–	Биопсийный материал	

**Таблица 2 – Методы исследования, использованные в работе**

Клинико-акустические методы	
- Оценка интенсивности боли - Субъективная оценка голоса - Время максимальной фонации - Непрямая ларингоскопия	- Визуально-аналоговая шкала (ВАШ) - Балльная шкала качества голоса Yanagihara (1967) - По методу Е. В. Лавровой (1984) - С помощью гортанных зеркал
Инструментальные методы	
Видеофибrolарингоскопия	Фибробронхоскоп Olympus TУPEP150 (Япония)
Биохимические методы	
Продукты окислительной модификации липидов	Экстракционно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-56 («ЛЮМО-Спектр», Санкт-Петербург) по методике И. А. Волчегорского и соавт. (Волчегорский И. А. и соавт., 1989; Волчегорский И. А. и соавт., 2000; Львовская Е. И. и соавт., 1991). В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оптическую плотность при 220 нм (содержание изолированных двойных связей), 232 нм (содержание диеновых конъюгатов – ДК), 278 нм (содержание кетодиенов и сопряженных триенов – КДиСТ), 400 нм (основания Шиффа – ШО). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е. и. о.): E <sub>232</sub> /E <sub>220</sub> (ДК), E <sub>278</sub> /E <sub>220</sub> (КДиСТ) и E <sub>400</sub> /E <sub>220</sub> (ШО)

Продукты окислительной модификации белков (ОМБ)	По реакции Фентона в спонтанном и металл-индуцированном режимах с последующей регистрацией на спектрофотометре альдегиддинитрофенилгидразонов(АДНФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) в ультрафиолетовой части спектра и области видимого света (Фомина М. А., Абаленихина Ю. В., 2014). Результат выражали в единицах оптической плотности на мг белка (у. е. / мг). Резервно-адаптационный потенциал (РАП, %) рассчитывали путем отношения продуктов спонтанного окисления к индуцированному
Определение белка	Биуретовым методом с использованием набора реагентов ОБЩИЙ БЕЛОК-ОЛЬВЕКС (Санкт-Петербург, Россия); в мг/л
Морфологические методы	
Морфология и морфометрия	Биопсийный материал фиксировали в 10 % растворе формалина, обезжировали, обезжиривали, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Микроскопию проводили на микроскопе DMRXA (Leika, Германия). Анализ данных с помощью программы ImageScoreM (Германия); ув. $\times 100$ и $\times 400$ . Морфометрические показатели представлены в расчете на $\text{мм}^2$
Иммунологические методы	
Иммуногисто-химический метод	На иммуногистостейнере Bench MarkXT (Ventana, США); для визуализации применяли универсальную систему Ultra View Universal DAB (Ventana, США) с использованием набора антител к рецептору CD3 (клон 2GV6), к CD4 (клон SP35), к CD8 (клон SP57), к CD20 (клон L26), к CD68 (клон Кр-1), к белку bcl-2 (клон 124), к регулятору клеточного цикла p53 (клон Bp53-11) и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (Super Frost Plus, Германия). Подсчет производили при ув. $\times 400$ на $1 \text{ мм}^2$ среза ткани
Определение цитокинового профиля тканей ЭППР	При помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе Lumineх Magpix 100 (США) с использованием тест-системы Bio-Plex (MERZ, Германия) для определения Fractalkine/CX3CL1, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 (p70), IL-6, IL-13, IL-17A/CTLA8, IL-2, IL-21, IL-23, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8/CXCL8, I-TAC/CXCL11, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, MIP-3 $\beta$ /CCL19, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ . Перерасчет содержания цитокинов производили на пг/мг белка

**Статистические методы исследования.** Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. Данные представлены в виде Me ( $Q_{25}$ ;  $Q_{75}$ ), где Me – медиана,  $Q_{25}$ ,  $Q_{75}$  – значения нижнего и верхнего квартилей. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса). Отличия считали статистически значимыми при уровне  $p \leq 0,02$ .

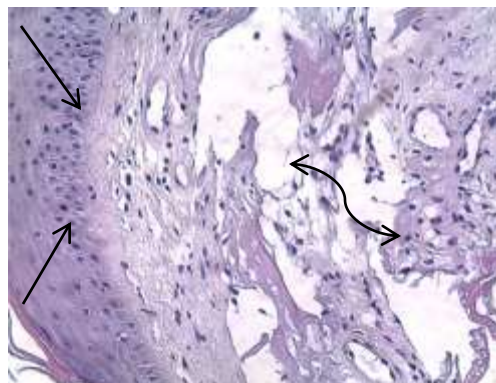
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На ранних сроках формирования ЭППР к характерным патоморфологическим особенностям можно отнести наличие выраженного стромального отека, расширение и истончение сосудов микрокапиллярного типа с расстройством кровообращения в виде явлений стаза, тромбоза, плазморрагий, отдельных зон пролиферации фибробластов. Подобная морфологическая картина характерна для ЭППР, условно обозначаемых как «мягкие», к которым относят полипы миксоидного типа и отек Рейнке.

Для ЭППР, обозначаемых как «плотные» (ангиоматозный тип полипов; узелки голосовых складок), характерными особенностями морфологии служат выраженная клеточная инфильтрация, гиалиноз стромы, отложения гемосидерина, фибронектина, утолщения суббазальной мембраны и собственной пластинки.

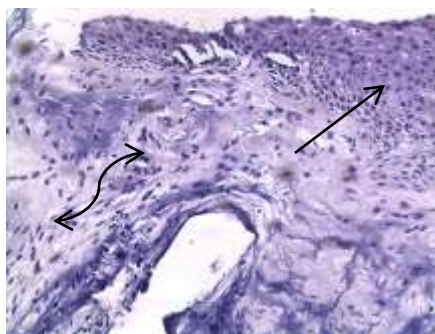
Морфометрический анализ тканей ЭППР, проводимый преимущественно в субэпителиальной зоне, включающей элементы мукозоассоциированной ткани региона гортани, выявил ряд особенностей клеточного состава: количество нейтрофилов в тканях всех изучаемых ЭППР оказалось самым малочисленным и не имело значимых различий между группами, что отражает отсутствие классических острых воспалительных изменений в тканях. В структуре тканей «плотных» новообразований, помимо высокой удельной площади сосудистой сети в соединительной ткани, зафиксировано значимое в сравнении с тканями «мягких» новообразований преобладание фибробластов, являющихся основными клеточными элементами стромы органа. Известно, что в условиях хронического перенапряжения голосовых складок или интоксикации, фибробласты (наряду с макрофагами) могут менять собственный фенотип на воспалительный и секретировать воспалительные белки, хемокины и факторы роста. Помимо этого, клетки дифферона фибробластов активно участвуют в процессах репарации, ремоделирования тканей в зонах ишемически-гипоксических изменений. Напротив, в тканях «мягких» новообразований в соединительнотканной зоне, кроме массы кистозно измененных полостей, заполненных серозным/или белковым трансудатом, отмечено большое представительство лимфоцитов и гистиоцитов, активно участвующих в реакциях иммунного реагирования.

Учитывая морфологические и морфометрические особенности различных форм ЭППР, предполагаем эволюцию новообразований в зависимости от длительности течения заболевания: к ранним формам можно отнести «мягкие» новообразования (миксоидные полипы и отек Рейнке) с дебютом в среднем менее одного года согласно анамнестическим данным (*рисунки 1, 2*); а к поздним формам – «плотные» новообразования (полипы ангиоматозного типа, голосовые узелки), ткани которых подвергались морфофункциональным изменениям в среднем более одного года (*рисунки 3, 4*). Все отделы голосовых складок выстланы многорядным цилиндрическим эпителием более приспособленным к механическому трению при фонации, за исключением медиальных краев голосовых складок, на которых формируются голосовые узелки. Ряд авторов также описывает стадийность формирования голосовых узелков от более «мягких» на ранних этапах с признаками расширения тонкостенных капилляров подслизистого слоя, отеком, признаками микрокровоизлияний, с появлением широкого основания. При продолжающейся голосовой нагрузке формируются отчетливые или сливающиеся узелки в виде полупрозрачных плотных утолщений, спаянных с подлежащими тканями, белесоватой или сероватой окраски, такой же, как и свободный край голосовой складки (*рисунок 3*).



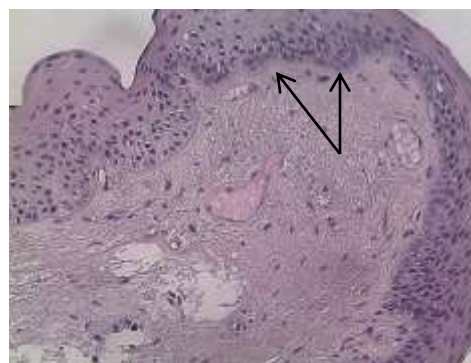
**Рисунок 1 – Полип миксоидного типа с кровоизлиянием («мягкий») левой голосовой складки**

*Примечание:* Видеофибrolарингоскопия (ув.  $\times 2$ ). Пациентка И., 42 года. Профессия – преподаватель. Дебют заболевания – 10 месяцев. Морфология: окраска – гематоксилин и эозин, ув.  $\times 200$ ; неравномерность расположения ядер клеток в пласте многослойного плоского эпителия (сплошные стрелки), резкий отек рыхлой соединительной ткани с формированием мелких полостей неправильной формы (волнистая стрелка).



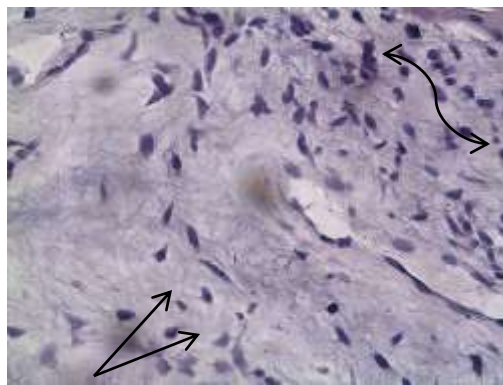
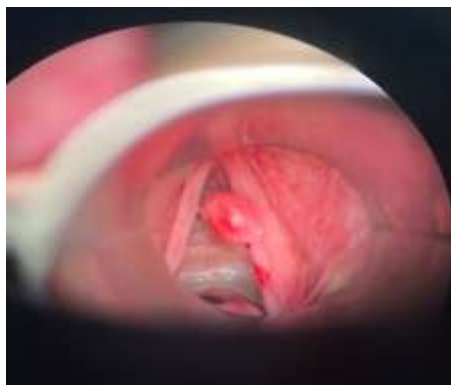
**Рисунок 2 – Отек Рейнке**

*Примечание:* Видеофибrolарингоскопия (ув.  $\times 2$ ). Пациентка Г., 34 года. Профессия – юрист. Стаж курения – 6 лет. Срок давности заболевания – менее 1 года. Морфология: окраска – гематоксилин и эозин, ув.  $\times 200$ ; утолщение покровного пласта многослойного плоского эпителия (сплошная стрелка), умеренный отек и разрыхление соединительнотканной стромы с рыхлой хронической воспалительной инфильтрацией (волнистая стрелка).



**Рисунок 3 – Голосовые узелки (начало формирования), симметричные**

*Примечание:* Видеофибrolарингоскопия (ув.  $\times 2$ ). Пациент С., 32 года. Профессия – актер. Срок давности заболевания – 6 месяцев. Морфология: окраска – гематоксилин и эозин, ув.  $\times 200$ ; явления умеренного акантоза многослойного плоского эпителия (стрелки).



**Рисунок 4 – Полип «плотный» ангиоматозного типа, на ножке**

*Примечание:* Видеофибrolарингоскопия (ув.  $\times 2$ ). Пациент Н., 37 лет. Профессия – спортивный тренер. Срок давности заболевания – 1,5 года. Морфология: окраска – гематоксилин и эозин, ув.  $\times 200$ ; участок огрубения стромы с пролиферирующими фибробластами (сплошные стрелки) и небольшой лимфогистиоцитарный инфильтрат (волнистая стрелка).

Согласно результатам иммуногистохимического исследования нами выделены четыре иммунофенотипа ЭППР:

- отек Рейнке – высокое содержание  $CD3^+$ -лимфоцитов,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$ ; низкое содержание  $CD68^+$ ; высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; низкое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия;

- миксоидный тип полипов – низкое содержание лимфоцитов  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$ , клеток моноцитарно-макрофагального ряда  $CD68^+$ ; высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; низкое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия;

- ангиоматозный тип полипов – низкое содержание лимфоцитов  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$ ; высокое – клеток моноцитарно-макрофагального ряда  $CD68^+$ ; MMP-9<sup>+</sup>; низкое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; высокое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов;

- голосовые узелки – низкое содержание лимфоцитов  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$ ; высокое – клеток моноцитарно-макрофагального ряда  $CD68^+$ ; MMP-9<sup>+</sup>; низкое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; высокое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов.

Литературные источники также свидетельствуют о содержании в зоне МАЛТ гортани и голосовых складок основных субпопуляций лимфоцитов:  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-лимфоцитов с экспрессией антигенов HLA класса II, макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток, гранулоцитов, эозинофилов, организованных в структурированные клеточные скопления (Barker E. et al., 2006; Debertin A. S. et al., 2006)

Таким образом, в тканях «мягких» новообразований установлено большее представительство основных популяций иммунных клеток ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$ ), а в образованиях с преобладанием ангиоматозно-фиброзного компонента («плотных») отмечена высокая численность клеток моноцитарно-макрофагального ряда  $CD68^+$  и клеток с экспрессией матриксной металлопротеиназы (MMP) 9, что свидетельствует о

более интенсивных процессах ремоделирования с последующей дегенерацией тканей. Определенный вклад в иммунную архитектуру вносят особенности структурной организации различных зон голосовых складок и лимфодренажной системы надгортанника, подгортанного пространства, голосовых складок (Рогова Л.Н. и соавт., 2011). В тканях «плотных» новообразований зафиксированы значительные нарушения микроциркуляции за счет лимфостаза, интерстициального отека, сопровождающиеся дистрофическими изменениями с развитием фиброза, избыточной васкуляризацией стромы, ремоделированием соединительнотканного матрикса, на что указывает высокое содержание MMP-9 в тканях голосовых узелков и ангиоматозном типе полипов. В то же время способность MMP-1, -9, разрушать все типы белков внеклеточного матрикса приводит к повышению проницаемости тканей патологически измененной области голосовых складок, способствует инициации реакций иммунного реагирования на фрагменты деградации белков, синтезу цитокинов различной функциональной направленности (Gu J., Huang Y., 2017; Jafarnejad M. et al., 2017).

Поддержание клеточного гомеостаза МАЛТ гортани зависит от согласованной работы ингибиторов и индукторов апоптоза и может изменяться в зависимости от характера патологического процесса. Сочетание высокого содержания bcl-2-позитивных лимфоцитов и низкого содержания p53-позитивных клеток базального эпителия в тканях «плотных» новообразований отражает высокую способность к выживанию клеточных популяций в условиях неоангиогенеза и формирования участков фиброза в условиях недостаточной оксигенации тканей. В то же время при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке, напротив, зафиксировано высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия на фоне низкого содержания bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия, что свидетельствует о низком потенциале выживаемости данных клеток.

Особенности иммунного и тканевого фенотипа МАЛТ предполагают различия и в составе биологически активных секреторных компонентов МАЛТ. Исследование цитокинового профиля тканей различных форм ЭППР показало, что ткани «плотных» полипов содержат значительно более высокие концентрации функционально связанных между собой IL-17A/CTLA8 и IL-23. Известно, что секретируемый дендритными клетками, макрофагами и в меньшей степени  $\gamma\delta$ -Т-клетками IL-23 является ключевым цитокином для поддержания пролиферирующего пула Т-хелперных клеток 17-го типа, способствует секреции ими эффекторных цитокинов: IL-17A/CTLA8, IL-21, IL-22, GM-CSF, участвующих в реализации противомикробного барьерного иммунитета, процессах регуляции дифференцировки дифферона фибробластов (Харинцева С.В., Таскина Е.С., 2018; Аптекарь И.А. и соавт., 2019; Shen J. et al., 2015; Hirota K. et al., 2018). Нельзя исключить, что повышение концентрации данных цитокинов в тканях «плотных» новообразований связано с активными процессами ремоделирования тканей, ангиоматозом, антигенной стимуляцией клеток, создающей предпосылки для аутоиммунизации. Изучение уровней регуляторов хемотаксиса в тканях «плотных» полипов показало наибольшую концентрацию представителей  $\alpha$ -хемокинов (СХС-

семейство), в частности, IL-8 и интерферон- $\gamma$  индуцируемого T-клеточного альфа хемоаттрактанта (I-TAC; семейство CXCL11), принимающих активное участие в активации, миграции и хемотаксисе иммунных клеток (Меняйло М.Е. и соавт., 2017). Активатором и основным регулятором продукции I-TAC является IFN- $\gamma$ ; I-TAC/CXCL11 в свою очередь способствует рекрутингу активированных Th1-лимфоцитов в зону формирования патологии и может проявлять ангиостатический эффект в отношении активно пролиферирующих эндотелиоцитов путем секреции CXCR3 на эндотелиальных клетках. Следует отметить, что в тканях «плотных» образований представительство фибробластов было высоким среди всех форм ЭППР, вероятно, именно поэтому в данных новообразованиях выявлена наибольшая концентрация указанных выше хемокинов. Фибробласты изменяют свой фенотип на воспалительный при повреждении микрососудов и воздействии первичных медиаторов воспаления, таких как циклооксигеназа-2, HIF-1 $\alpha$ , протеазы (MMP-2, -9), структурных белков (фибронектина, декорина), способных менять сигнализацию и активировать факторы врожденного иммунитета, например, дендритные клетки, макрофаги, NK-клетки (Зорина А.И. и соавт., 2011; Шурыгина И.А. и соавт., 2012). Имеются данные о способности фибробластов модулировать раннюю экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-8/CXCL8, I-TAC/CXCL11, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4) и позднюю экспрессию факторов роста (TGF- $\beta$ ), участвуя таким образом в процессах регенерации и ремоделирования тканей, как при формировании самой патологии, так и после оперативного удаления новообразований, поскольку избыточное образование внеклеточного матрикса при повышенной стимуляции коллагенообразующей функции фибробластов, например, факторами роста TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , может привести к стойкому нарушению голосообразующей функции.

В супернатантах тканей «мягких» полипов (миксоидный тип) и отека Рейнке нами зафиксировано повышение концентрации CCL-хемокинов – MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\beta$ ), CX3C-хемокинов и фракталкина (CX3CL1), которые продуцируются преимущественно моноцитами, эндотелиоцитами, что отражает включение реакций иммунного реагирования при формировании данной патологии. Представители  $\beta$ -хемокинов – мощные хемоаттрактанты для клеток врожденного и адаптивного иммунитета, профиль рецепторов к CCL-хемокинам на клетках может избирательно меняться в зависимости от степени дифференцировки клетки (Hauser M.A., Legler D.F., 2016). Макрофагальные воспалительные белки – MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\alpha$ ; 3 $\beta$ ), экспрессируясь, в основном, на активированных моноцитах/макрофагах, фибробластах, имеют способность связываться с внеклеточными протеогликанами – компонентами внеклеточного матрикса, активно поглощать транссудат, способствуя защите тканей голосовых складок от повышенного гидростатического давления; связывать в качестве корецепторов факторы роста (фактор роста эндотелия сосудов -VEGF, трансформирующий фактор роста  $\beta$  – TGF- $\beta$ , фактор роста эндотелия), тем самым способствуя их концентрации и стабилизации. Фракталкин (CX3C-хемокин) повышает селектин-опосредованную адгезию клеток врожденного



(моноцитов, NK-клеток) и адаптивного (Т-лимфоцитов) иммунитета (Меснянкин О.А. и соавт., 2017).

Наличие элементов хронического воспалительного процесса в тканях ЭППР предполагает активацию секреторной способности клеток к продукции цитокинов различной регуляторной направленности. Нами установлено значимое повышение концентрации IL-10 в тканях «мягких» новообразований, обладающего противовоспалительным и иммуносупрессивным эффектом, а также гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), известного, помимо гемопоэтической активности, способностью индуцировать девиацию иммунного ответа в сторону Th1-типа (Зурочка А.В. и соавт., 2016). Интерлейкин-10 может ограничивать избыточный синтез провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$  активированными макрофагами и Т-хелперами 1-го типа. Лимитирование неоангиогенеза посредством IL-10-зависимого ингибирования продукции проангиогенных факторов роста (VEGF) и стимуляции продукции MMP-9 играет важнейшую роль в процессах тканевого ремоделинга. Именно ткани «мягких» ЭППР наиболее страдают в результате гипоксически-ишемических процессов в силу механического сдавления подлежащих тканей отечной жидкостью, и на фоне высокой экспрессии p53 на клетках базального эпителия повышение в тканях уровня GM-CSF способствует пополнению популяции данной клеточной линии и повышению выживаемости клеток в условиях гипоксии. Напротив, в тканях «плотных» новообразований, где наиболее активно происходят процессы ремоделирования тканей, неоангиогенез, установлено повышение концентрации VEGF и TGF- $\beta$ . Секреторную активность фибробластов в отношении экспрессии VEGF, TGF- $\beta$ , иных компонентов внеклеточного матрикса, матриксных металлопротеиназ увеличивает повышенный уровень гипоксией индуцированного фактора 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (Светозарский Н.Л. и соавт., 2015). TGF- $\beta$  играет роль супрессора продукции провоспалительных цитокинов, модулятора генов, вовлеченных в ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, метаболизм протеинов, сигнальную систему клетки и пролиферацию, может модулировать клеточный рост и обновление путем ингибиции клеточного цикла в фазе G1 и способность к индукции апоптоза путем трансформации Foxp3<sup>+</sup> Treg-лимфоцитов из наивных клеток-предшественников (Аптекарь И.А. и соавт., 2019).

Ишемически-гипоксические изменения в тканях голосовых складок не только индуцируют активацию иммунокомпетентных клеток МАЛТ, но и способствуют развитию оксидативного клеточного стресса путем генерации активных форм кислорода (АФК) и продуктов свободнорадикального окисления (СРО), избыточно образующихся в митохондриях активированных иммунокомпетентных клеток, эндотелиоцитах. Нами установлено значимое увеличение в тканях «мягких» новообразований количества диеновых конъюгатов в гептановой и изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы и оснований Шиффа в гептановой фазе, накопление карбонильных производных белков, преимущественно альдегидов нейтрального характера, регистрируемых в области УФ-спектра, что свидетельствует о преобладании продукции АФК в тканях с



избытком жидкостного компонента, способствующей развитию окислительного клеточного стресса и поддержанию хронического воспаления. Роль изменений тканевого и иммунного гомеостаза голосовых складок, процессов свободнорадикального окисления в патогенезе различных форм ЭППР представлена на интегральной схеме (рисунк 5).

Формирование ЭППР клинически и эндоскопически не сопровождается развитием острого воспаления в тканях голосовых складок, однако морфологически при всех формах ЭППР определяются признаки хронических воспалительных изменений, на что указывает и повышение в тканях концентрации некоторых цитокинов и хемокинов, продуктов ПОЛ и ОМБ. Консервативная стратегия лечения ЭППР, как правило, не приводит к стойкому клинически приемлемому эффекту и в последующем требует оперативного лечения, сопровождающегося дополнительной травматизацией тканей и развитием реактивного воспалительного процесса в зоне операции. Именно поэтому в раннем послеоперационном периоде важно назначение восстановительной терапии, включающей голосовой покой, очищение, увлажнение, стимуляцию репаративных процессов.

После удаления новообразований голосовых складок у всех пациентов в первые сутки наблюдался реактивный воспалительный процесс в зоне оперативного вмешательства, с максимальной выраженностью клинических проявлений на 2–3-и сутки. Применение топической озонотерапии на зону оперативного вмешательства начиная со 2-х суток послеоперационного периода позволило установить ряд положительных эффектов озона в сравнении с подгруппой, получающей только ингаляции 0,9 % физиологического раствора (таблица 3):

- **на 7-е сутки** значительно уменьшились проявления боли, гиперемии, отека, инфильтрации тканей, степень охриплости голоса; увеличилось время максимальной фонации (ВМФ); зафиксировано снижение содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ, ранних и поздних маркеров ОМБ в спонтанном и индуцированном режиме, уровней TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8/CXCL8, I-TAC/CXCL11 в слизистом отделяемом до показателей здоровых лиц; увеличилось содержание IL-4, GM-CSF, VEGF, TGF- $\beta$ , что отражает интенсивность репаративных процессов;

- **на 10-е сутки** клинические признаки воспаления (гиперемия, боль, отек) редуцированы до показателей здоровых лиц; значительно уменьшилась охриплость голоса, увеличилось до уровня здоровых лиц ВМФ; снизилась концентрация продуктов ПОЛ, ОМБ до уровней здоровых лиц; сохранились повышенными уровни факторов, участвующих в репарации (GM-CSF, VEGF, TGF- $\beta$ ).

Полагаем, что зафиксированное нами улучшение клинических, акустических, иммунологических и биохимических показателей в раннем послеоперационном периоде на фоне применения локальной озонотерапии реализовано за счет мультимодальных эффектов озона:

- *противовоспалительного* – за счет способности молекулы озона и продуктов его метаболизма (пероксид озона, 4-HNE) проникать в цитоплазму иммунокомпетентных клеток и модулировать действие транскрипционных факторов Nrf2, NF- $\kappa$ B и др. (Pecorelli

A. et al., 2013; Bocsi V., Valacchi G., 2015). Озон и продукты озонолиза подавляют активность NF-κB и продукцию провоспалительных цитокинов (IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8/CXCL8 и др.) (Martínez-Sánchez G. et al., 2020). Снижение синтеза хемокинов IL-8/CXCL8, I-TAC/CXCL11 ограничивает рекрутинг и накопление в воспаленных тканях нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, как следствие, уменьшаются процессы СРО, площадь вторичной альтерации; снижение синтеза IL-6 уменьшает выраженность ответа острой фазы (Челомбитько М.А., 2018; Manoto S.L. et al., 2018);

- *противоболевого*, обусловленного окислительной модификацией медиаторов воспаления, продуктов распада белковых молекул (алгопептидов), участвующих в передаче ноцицептивного сигнала в ЦНС, снижением продукции провоспалительных цитокинов, АФК;

- *регулирующего редокс-статус клетки* путем образования в ней неклассических вторичных мессенджеров, в частности 4-HNE (4-гидроксиноненаля), вторично запускающих адаптивный ответ через активацию в клетках ядерного редокс-чувствительного фактора транскрипции Nrf2. Пероксиды озона инициируют передачу сигнала через комплекс Keap1/Nrf2 с последующей модификацией белка KEAP и транслокацией Nrf2 в ядро (Rojo de la Vega M. et al., 2018; Wang Z. et al., 2018). Nrf2 взаимодействует в ядре с ARE (antioxidant response elements) и активирует синтез хинооксидоредуктазы-1 (NQO1), гемоксигеназы-1 (HO-1), СОД, гемоксигеназы и др. (Viebahn-Haensler R. et al., 2021), тем самым повышая антиоксидантный потенциал клетки. Ограничение под влиянием озона окислительной деструкции липидов и белков способствует коррекции гипоксии и микроциркуляторных нарушений, ликвидации энергодефицита, что в целом оказывает позитивное влияние на процессы репарации;

- *корректора гипоксии* вследствие влияния на внутриклеточный эритроцитарный метаболизм с повышением уровня 2,3-дифосфоглицерата при озонолизе полиненасыщенных жирных кислот, что облегчает отдачу кислорода в недостаточно кровоснабжаемых тканях и поддерживает адекватный репаративный ответ (Bocsi V., 2012; 2015). Снижение уровня TNF-α, являющегося ингибитором выработки эритропоэтина, приводит к восстановлению регуляции эритропоэза. Под действием озона мембрана эритроцита становится более эластичной и деформируемой, что улучшает гемореологию (Bocsi V., 2012).

- *репаративного* за счет увеличения миграции фибробластов в зону воспаления, реализуемой через сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR (Xiao W. et al., 2017). Фибробласты, продуцируя коллаген IV типа, эластин, гликопротеины, протеогликаны, ламинин, оказывают положительное влияние на формирование базальной мембраны клеток, что обеспечивает опорно-механическую функцию тканей. Тканевые фибробласты участвуют в неоангиогенезе посредством продукции проангиогенных факторов: VEGFs, FGFs, TGF-β1, HGF/SF и ангиопоэтина-1, индуцирующих дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток.

**Таблица 3 – Содержание провоспалительных цитокинов и показателей окислительной модификации липидов и белков в слизистом отделяемом голосовых складок на фоне озонотерапии [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР				
		Группа 2 До хирургич. удаления, n=72	7-е сутки		10-е сутки	
			Подгруппа 2а, n=36	Подгруппа 2б, n=36	Подгруппа 2а, n=36	Подгруппа 2б, n=36
IFN- $\gamma$	5,3 (4,3; 6,4)	6,4 (4,2; 9,1)	18,9 (12,1; 23,3) *,**	12,7 (10,2; 14,3) *,**	11,3 (8,5; 12,5) *	7,1 (5,5; 8,3) #
TNF- $\alpha$	2,6 (1,4; 4,2)	3,8 (1,3; 4,7)	14,1 (10,5; 16,1) *,**	9,2 (6,6; 11,4) *,**,#	6,8 (4,7; 8,9) *,**	4,1 (2,8; 5,1) #
IL-1 $\beta$	4,8 (3,2; 6,1)	5,9 (4,6; 8,2)	15,0 (12,3; 17,7) *,**	12,1 (10,3; 14,2) *,**	9,9 (8,2; 10,4) *,**	6,8 (5,8; 7,2) #
IL-6	2,3 (1,4; 4,2)	3,2 (1,3; 4,6)	9,3 (6,3; 10,1) *,**	5,3 (4,8; 7,8) *,** *,#	4,1 (3,8; 6,2)	4,2 (3,2; 5,1)
IL-8/ CXCL8	13,1 (10,4; 6,2)	12,4 (10,8; 15,2)	24,3 (20,5; 26,2) *,**	16,7 (14,1; 19,3) #	18,6 (16,9; 19,1) *,**	14,6 (12,3; 15,8) #
I-TAC/ CXCL11	14,4 (11,6; 16,2)	15,3 (12,4; 16,5)	19,2 (18,1; 23,2) *,**	13,4 (8,6; 15,7) #	16,3 (14,6; 17,8)	12,3 (9,6; 14,3) #
ДК (г)	0,45 (0,40; 0,64)	0,55 (0,50; 0,62)	0,79 (0,68; 0,84) *,**	0,62 (0,50; 0,67) *,#	0,74 (0,65; 0,79) *,**	0,61 (0,50; 0,62) #
КДиСТ (г)	0,22 (0,18; ,25)	0,26 (0,21; 0,28)	0,33 (0,30; 0,35) *,**	0,28 (0,24; 0,32) #	0,30 (0,28; 0,33) *,**	0,27 (0,25; 0,28) #
ШО (г)	0,01 (0,01; 0,02)	0,02 (0,01; 0,04)	0,20 (0,09; 0,23) *,**	0,06 (0,05; 0,08) *,#	0,07 (0,04; 0,10) *,**	0,03 (0,02; 0,04) #
ДК (и)	0,33 (0,24; 0,36)	0,31 (0,29; 0,33)	0,53 (0,48; 0,56) *,**	0,32 (0,29; 0,34) #	0,33 (0,22; 0,35)	0,32 (0,23; 0,36)
КДиСТ (и)	0,25 (0,26; 0,29)	0,28 (0,26; 0,33)	0,54 (0,37; 0,60) *,**	0,32 (0,30; 0,37) #	0,45 (0,38; 0,48)	0,26 (0,24; 0,27) #
ШО (и)	0,02 (0,01; 0,04)	0,02 (0,01; 0,03)	0,09 (0,05; 0,13) *,**	0,06 (0,04; 0,10) *,**,#	0,06 (0,04; 0,08)	0,02 (0,01; 0,03) #
S <sub>ОМБ</sub> инд.	328,1 (319,4; 387,7)	335,2 (313,3; 437,5)	688,5 (472,4; 786,2) *,**	379,0 (293,2; 437,1) #	456,3 (421,6; 612,3) *,**	325,6 (235,4; 375,6) #
S <sub>АДНФГ</sub>	282,5 (276,4; 311,7)	289,6 (286,6; 320,2)	525,7 (386,7; 697,1) *,**	323,7 (205,3; 421,4) #	386,3 (259,6; 412,3) *,**	268,9 (221,1; 298,6) #
S <sub>КДНФГ</sub>	42,8 (38,2; 69,7)	48,7 (31,2; 57,8)	88,2 (74,5; 109,5) *,**	52,7 (43,1; 69,6) #	76,3 (64,3; 84,5) *,**	47,6 (38,5; 53,6) #
S <sub>ДНФГ uv</sub>	311,8 (251,0; 429,3)	299,8 (241,0; 433,3)	534,5 (378,5; 776,3) *,**	374,1 (259,3; 432,2) #	456,9 (325,4; 612,3) *,**	269,7 (213,5; 321,5) #
S <sub>ДНФГ vs</sub>	38,5 (28,9; 51,1)	34,5 (23,8; 48,5)	78,3 (74,5; 102,2) *,**	41,3 (31,2; 53,4) #	67,5 (54,2; 89,3) *,**	39,7 (28,6; 45,3) #

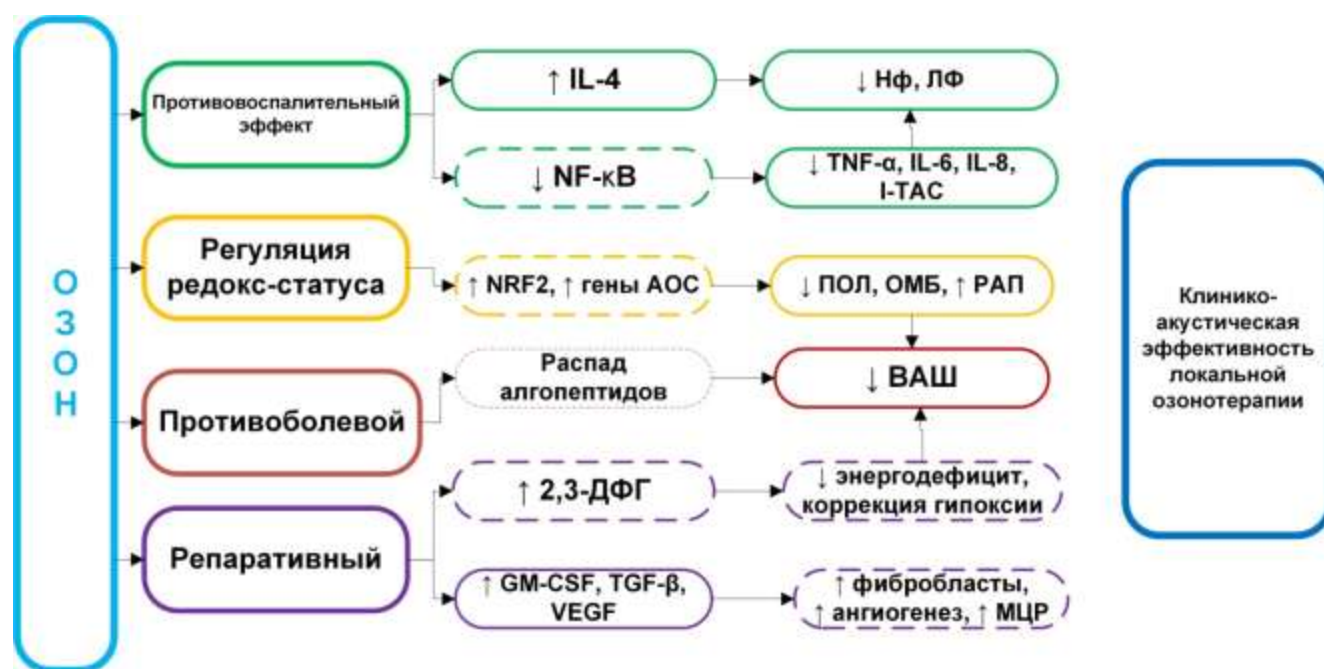
Примечание: \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с группой 1; \*\* – с группой 2; # – с подгруппой 2а.



Рисунок 5 – Роль изменений тканевого и иммунного гомеостаза голосовых складок, процессов свободнорадикального окисления в патогенезе различных форм ЭППР

Ключевые механизмы протекторного действия озона, применяемого локально в раннем послеоперационном периоде оперативного лечения ЭППР, представлены на интегральной схеме (рисунк 6).

Таким образом, нами установлены противовоспалительный, корригирующий гипоксию, антиоксидантный, противоболевой, ограничивающий окислительную деструкцию липидов и белков эффекты озона, способствующие ограничению зоны вторичной альтерации, уменьшению выраженности воспалительных изменений, активации репаративных процессов в ране, что в целом доказывает его эффективность и обосновывает целесообразность применения локальной озонотерапии в раннем послеоперационном периоде оперативного лечения ЭППР.



**Рисунок 6 – Механизмы протекторного действия озона в раннем послеоперационном периоде хирургического лечения ЭППР**

*Примечание:* Сплошные линии – данные собственного исследования, пунктирные – из литературных источников).

## ВЫВОДЫ

1. Особенности морфологии и морфометрии полипов миксоидного типа и отека Рейнке включают наличие выраженного стромального отека, расширение и истончение микрососудов, высокую удельную площадь жидкостного компонента, стаз, тромбоз; высокое содержание гистиоцитов, лимфоцитов, низкое – нейтрофилов.

2. Для полипов ангиоматозного типа и голосовых узелков характерны выраженная клеточная инфильтрация, гиалиноз стромы, отложения белков внеклеточного матрикса, утолщение базальной мембраны и собственной пластинки, высокая удельная площадь сосудистой сети, высокое содержание фибробластов, низкое – нейтрофилов.

3. По результатам иммуногистохимического анализа выделено четыре иммунофенотипа, соответствующих формам экссудативных поражений пространства Рейнке: отек Рейнке – высокое содержание CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, p53<sup>+</sup> клеток базального эпителия; низкое – CD68<sup>+</sup>; bc1-2<sup>+</sup> лимфоцитов; миксоидный тип полипов – низкое содержание CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, bc1-2<sup>+</sup> лимфоцитов; высокое содержание p53<sup>+</sup> клеток базального эпителия; ангиоматозный тип полипов – низкое содержание CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>; p53<sup>+</sup> клеток базального эпителия; высокое – CD68<sup>+</sup>, MMP-9<sup>+</sup>, bc1-2<sup>+</sup> лимфоцитов; голосовые узелки – низкое содержание CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, p53<sup>+</sup> клеток базального эпителия; высокое – CD68<sup>+</sup>, MMP-9<sup>+</sup>; bc1-2<sup>+</sup> лимфоцитов.

4. Изменения цитокинового профиля и редокс-статуса тканей «мягких» новообразований включают увеличение количества IL-10, GM-CSF, хемокинов MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\beta$ , фракталкина, накопление диеновых конъюгатов в гептановой и изопропанольной фазе, оснований Шиффа в гептановой фазе липидного экстракта, первичных продуктов окислительной модификации белков, преимущественно нейтрального характера; в тканях «плотных» новообразований наблюдается повышение уровней IL-17A, IL-23, IL-8, I-TAC, VEGF, TGF- $\beta$ .

5. Применение локальной озонотерапии в раннем послеоперационном периоде хирургического лечения новообразований голосовых складок, вне зависимости от установленного морфологического типа, оказывает положительное влияние на динамику воспалительных изменений в ране.

6. На 7-е сутки локального применения озонотерапии в слизистом отделяемом снижается содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, ранних и поздних маркеров окислительной модификации белков, регистрируемых в спонтанном и индуцированном режиме, увеличивается резервно-адаптационный потенциал, снижается концентрации TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, I-TAC до показателей здоровых лиц, увеличивается содержание IL-4, GM-CSF, VEGF, TGF- $\beta$ , что отражает интенсивность репаративных процессов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Пациентам вне зависимости от морфологического типа экссудативных поражений пространства Рейнке голосовых складок в раннем послеоперационном периоде рекомендовано применение аппликаций озонированного растительного масла на зону оперативного вмешательства.

2. Процедуру локальной озонотерапии проводить следующим образом: при помощи не прямой ларингоскопии проводить аппликацию в виде орошения зоны оперативного вмешательства и прилежащих тканей озонированным оливковым маслом при помощи гортанных вливаний 1 раз в день, ежедневно, на протяжении 7 дней. После проведения процедуры прием пищи и жидкости не рекомендуется в течение 1 часа при соблюдении строгого голосового покоя.

3. Данные о клинико-эндоскопических и морфологических особенностях различных форм экссудативных поражений пространства Рейнке следует использовать в дифференциальной диагностике данной патологии в практической оториноларингологии.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus:*

1. **Ковалев, М.А.** Иммунный фенотип тканей экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 3. С. 507–518 (Scopus, IF = 0.6, Q4; PubMed; ИФ РИНЦ – 0,718, K1).

2. **Ковалев, М.А.** Экспрессия регуляторов хемотаксиса в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова // Российский иммунологический журнал. 2022. Т. 25, № 2. С. 195–200 (Scopus, IF = 0.11, Q4; ИФ РИНЦ – 0,394, K1).

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:*

3. Клинико-иммунологическая эффективность применения топической озонотерапии после хирургического лечения экссудативных поражений пространства Рейнке / **М.А. Ковалев**, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка, Ю.А. Первухина // Южно-Уральский медицинский журнал. 2023. № 1. С. 18–26 (ИФ РИНЦ – 0,145, K3).

4. **Ковалев, М.А.** Влияние локальной озонотерапии на показатели окислительной модификации липидов и белков после лазерного удаления полипов голосовых складок: [электр. текст] / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка // Современные проблемы науки и образования. 2023. № 2. URL: <https://science-education.ru/article/view?id=32584>. (ИФ РИНЦ – 0,528, K1).

5. **Ковалев, М.А.** Клинико-морфологические параллели при разных вариантах экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е. В. Давыдова, А. В. Зурочка // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2022. Т. 19, № 5. С. 443–451. (ИФ РИНЦ – 0,433, K2).

6. **Ковалев, М.А.** Сравнительная оценка продуктов окислительной модификации липидов и белков в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2022. Т. 19, № 4. С. 379–385 (ИФ РИНЦ – 0,433, K2).

7. **Ковалев, М.А.** Характеристика морфометрических показателей в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, Л.В. Астахова // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2022. Т. 19, № 3. С. 333–338 (ИФ РИНЦ – 0,433, K2).

8. **Ковалев, М.А.** Цитокиновый профиль тканей экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка // Южно-Уральский медицинский журнал. 2022. № 4. С. 37–45 (ИФ РИНЦ – 0,145, K3).

9. Влияние озонированного растительного масла на уровни провоспалительных цитокинов при хроническом отечно-полипозном ларингите / **М.А. Ковалев**, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка, М.В. Лобанова, А.Е. Бакеева // Южно-Уральский медицинский журнал. 2021. № 3. С. 110–117 (ИФ РИНЦ – 0,145, K3).

*Публикации в других изданиях:*

10. **Ковалев, М.А.** Содержание хемотаксических факторов в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова // Вестник Челябинской областной клинической больницы. 2023. № 1 (55). С. 44–48.

11. **Ковалев, М.А.** Акустический анализ голоса у пациентов после лазерного удаления полиповидных образований гортани с проведением локальной озонотерапии // Шесть

десятилетий на страже здоровья воинов и жителей Подмосквья: материалы юбилейной научно-практической конференции (24 нояб. 2022 г., г. Одинцово). Одинцово, 2022. С. 323–329.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны	ОМБ – окислительная модификация белков
АФК – активные формы кислорода	ПОЛ – перекисное окисление липидов
ВАШ – визуально-аналоговая шкала	РАП – резервно-адаптационный потенциал
ВМФ – время максимальной фонации	СОД – супероксиддисмутаза
ДК – диеновые конъюгаты	СРО – свободнорадикальное окисление
ДНФГ – динитрофенилгидразоны	ШО – основания Шиффа
КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены	HLA – Human Leukocyte Antigens
КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны	ММР-9 – матриксная металлопротеиназа 9
МЦР – микроциркуляторное русло	

КОВАЛЕВ

МИХАИЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ

## ИММУННЫЕ ФАКТОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭКССУДАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ И ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТОПИЧЕСКОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

3.2.7. Иммунология

3.3.3. Патологическая физиология

### АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук