

Министерство высшего образования и науки  
Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

**Институт иммунологии и физиологии**

Уральского отделения Российской академии наук

*На правах рукописи*

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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

Зурочка А.В., доктор медицинских наук,  
профессор, Заслуженный деятель науки РФ;

Давыдова Е.В., доктор медицинских наук,  
доцент

Екатеринбург – 2023

**СОДЕРЖАНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ЭКССУДАТИВНЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ: КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА .....	11
1.1. Общая характеристика экссудативных поражений пространства Рейнке .....	11
1.2. Особенности микробиома гортани при экссудативных поражениях пространства Рейнке .....	14
1.3. Значение мукозоассоциированной ткани региона гортани в развитии экссудативных поражений пространства Рейнке.....	16
1.4. Морфофункциональный полиморфизм тканей голосовых складок при формировании экссудативных поражений пространства Рейнке ....	20
1.5. Современные принципы терапии экссудативных поражений пространства Рейнке и перспективные направления коррекции.....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	33
2.1. Материалы исследования.....	33
2.2. Методы исследования.....	39
2.2.1. Клинико-anamнестические методы исследования.....	40
2.2.2. Клинико-функциональная диагностика экссудативных поражений пространства Рейнке .....	42
2.2.3. Биохимические исследования.....	42
2.2.4. Морфологические и иммуногистохимические методы исследования.....	46
2.2.5. Определение цитокинов .....	47
2.2.6. Методы статистической обработки результатов .....	48

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
3.1. Характеристика изменений тканевого гомеостаза при разных формах экссудативных поражений пространства Рейнке .....	49
3.1.1. Клинико-морфологическая характеристика различных форм экссудативных поражений пространства Рейнке .....	49
3.1.2. Характер изменений цитокинового профиля, параметров адаптивного иммунитета, маркеров клеточного обновления и ремоделинга в зоне мукозоассоциированной лимфоидной ткани региона гортани при различных формах экссудативных поражений пространства Рейнке .....	64
3.1.3. Оценка показателей свободнорадикального окисления в тканях голосовых складок при различных формах экссудативных поражений пространства Рейнке .....	82
3.2. Применение топической озонотерапии в раннем послеоперационном периоде после хирургического лечения экссудативных поражений пространства Рейнке .....	85
3.2.1. Изменения клинико-инструментальных и акустических параметров на фоне применения топической озонотерапии в послеоперационном периоде .....	85
3.2.2. Влияние топической озонотерапии на изменение уровней про- и противовоспалительных цитокинов, показателей редокс-статуса в раннем послеоперационном периоде .....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	106
ВЫВОДЫ.....	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

## ВВЕДЕНИЕ

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

Эксудативные поражения пространства Рейнке (ЭППР) голосовых складок относятся к доброкачественной опухолеподобной патологии гортани и составляют, по данным разных авторов, 50–75 % [9, 40, 59]. Особая медико-социальная значимость ЭППР обусловлена их важным влиянием на профессиональную сферу жизни пациентов, поскольку они чаще наблюдаются у профессионалов голоса [181].

В структуре ЭППР различают полипы голосовых складок, встречающиеся в 40–69 %, отек Рейнке – в 5–7 % случаев и голосовые узелки (10–24 % случаев) [9, 91, 193, 214]. Ключевым этиологическим фактором формирования различных форм ЭППР является постоянное перенапряжение голосового аппарата, часто в сочетании с воздействием химических раздражителей (табачного дыма) [67, 219].

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 [67, 219].

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, НК-клетки с экспрессией молекул HLA класса II, а также гранулоциты и эозинофилы, организованные в структурированные клеточные скопления [103, 188, 204, 205, 216].

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 [31, 39, 146].

Мультимодальные свойства медицинского озона позволяют прогнозировать положительный терапевтический эффект [11, 18, 31, 39, 44, 45, 57, 58, 60-63, 75, 76, 85, 128, 131, 161, 167, 172, 207].

**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 видеофибрларингоскопии и гистологического исследования биопсийного материала. Методы исследования включали: клиничко-инструментальные, морфологические, биохимические, иммунологические, статистические.

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

1. Формирование различных форм экссудативных поражений пространства Рейнке сопровождается характерной клиничко-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-й 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).

## ГЛАВА 1 - ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

### ЭКССУДАТИВНЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ПРОСТРАНСТВА РЕЙНКЕ: КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА

#### 1.1 - Общая характеристика экссудативных поражений пространства Рейнке

Экссудативные поражения пространства Рейнке (ЭППР) имеют особую медико-социальную значимость, обусловленную широкой распространенностью патологии и ее важным влиянием на социальную, в частности, профессиональную сферу жизнедеятельности пациентов. Чаще всего ЭППР поражают профессионалов голоса: актеров, певцов, комментаторов, преподавателей, дикторов; относятся к обширной группе опухолеподобных невоспалительных заболеваний гортани и имеют схожие клинические и морфогенетические признаки [9, 40, 59, 179]. Распространенность ЭППР среди всей доброкачественной продуктивной патологии гортани достаточно высока и составляет 50–75 % [9, 40, 54].

Среди ЭППР различают полипы голосовых складок, голосовые узелки и отек Рейнке, общей патогенетической основой которых является повышение проницаемости сосудистой стенки и скопление отечной жидкости в интерстициальной ткани пространства Рейнке в условиях недостаточного отведения лимфы в силу анатомических особенностей морфоархитектоники лимфатической системы региона гортани.

Полипы голосовых складок по данным различных авторов, в структуре ЭППР встречаются в 40–69%, отек Рейнке – в 5–7%, голосовые узелки – в 10–24% случаев [3, 181, 185]. Эпидемиологические исследования, проведенные в Корее, показали, что полипы голосовых складок в общей популяции встречаются с частотой 3,5 случая на 1000 населения [191].

Полипы чаще диагностируют у мужчин среднего возраста, после 30–40 лет, однако они нередко встречаются и в подростковом возрасте;

располагаются на желудочковой поверхности одной или двух голосовых складок [9, 59, 187, 219].

Узелки голосовых складок (синонимы: певческие, ларингеальные узелки, нодозный хордит) располагаются, как правило, симметрично, на медиальной поверхности передней или средней трети обеих истинных голосовых складок, чаще встречаются у молодых и среднего возраста (20–50 лет) женщин, имеющих длительные и интенсивные голосовые нагрузки [3, 9, 41, 42], могут поражать детей, чаще мальчиков подросткового возраста.

Отек Рейнке (синонимы: хроническая отечная дегенерация, полиповидная дегенерация голосовых складок, хроническая отечная гипертрофия) – хроническое диффузное, чаще двустороннее отечное набухание мембранозной части голосовых складок с изменением вязкоупругих свойств на фоне расширения субэпителиального пространства [9, 67, 193]. Риск малигнизации при отеке Рейнке низок, а дисплазия обнаруживается в 0–3% случаев [193].

На основании ларингоскопической картины авторы [69] выделяют 4 типа отека Рейнке: первый характеризуется отеком Рейнке одной голосовой складки; второй – отеком Рейнке обеих голосовых складок; третий – отеком Рейнке одной голосовой складки, ассоциированным с односторонним полиповидным поражением голосовой складки; и четвертый тип – отеком Рейнке обеих голосовых складок, ассоциированным с двусторонним полиповидным поражением обеих голосовых складок.

Тем не менее, в ряде доступных литературных источников имеется определенное несоответствие терминологии и описания клинико-морфологических проявлений собственно отека Рейнке, относящегося к ЭППР и имеющего экссудативную природу заболевания, и хронического отечно-полипозного ларингита Рейнке-Гайека, который входит в группу воспалительных заболеваний гортани и имеет морфологические признаки диффузной хронической воспалительной инфильтрации голосовых складок [9, 40, 59, 67].

Среди этиологических факторов формирования ЭППР основными считаются чрезмерное перенапряжение голосового аппарата (так называемая хроническая фонотравма) [41] и неблагоприятное воздействие на слизистую оболочку верхних дыхательных путей различных химических раздражителей, в том числе табакокурение. Последнее является наиболее частой бытовой интоксикацией, включая пассивное вдыхание табачного дыма, хотя далеко не у всех курящих возникают голосовые узелки и полипы голосовых складок [8, 14], однако среди пациентов с ЭППР более 70% являются табакокурильщиками [9]. В качестве факторов риска рассматривают ингаляционные поражения голосовых складок, связанные с профессиональной деятельностью, травмы голосовых связок инородным телом, гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь (ГЭРБ), ларингофарингеальный рефлюкс [41, 42, 67, 77, 100, 178, 220]. Исследована роль аллергических состояний, хронической патологии бронхолегочной системы, носа и околоносовых пазух, нарушения разделительной функции гортани, оперативных вмешательств в патогенезе ЭППР [3, 54, 107, 157]. Изучение роли конституциональных и эндокринных факторов (гипотиреозидизм) в патогенезе ЭППР по-прежнему остается в сфере интересов клиницистов и патоморфологов [3, 8, 9, 14].

Некоторые исследователи отмечают частое сочетание полипов голосовых складок с наличием метаболического синдрома, особенно в женской популяции [105, 121, 125, 186].

В последние десятилетия большое значение в генезе ЭППР придается техногенному загрязнению окружающей среды [105, 109, 117, 121, 137, 197]. Отмечено, что именно в верхних дыхательных путях атмосферный воздух очищается от твердых крупнодисперсных частиц, способствующих запуску процессов окислительного клеточного стресса, нарушению фагоцитарной функции макрофагов, включению механизмов патологического неоангиогенеза [105, 108, 109, 114, 115, 139].

Эндоларингоскопическая картина ЭППР крайне вариабельна: от легкой веретенообразно-стекловидной опухоли, которая выглядит как «брюшко», до тяжелого флотирующего утолщения при отеке Рейнке, вызывающего удушье. Чаще отек начинается с голосового отростка, постепенно уменьшаясь к переднему отделу [67, 157]. Полиповидные образования имеют студенистую консистенцию, полупрозрачные, серого или серо-розового цвета, расположены по медиальному, верхнему и нижнему краю голосовой складки, часто флотируют, закрывая на вдохе голосовую щель. Полипы могут захватывать до двух третей голосовой складки, не распространяясь на заднюю и латеральную поверхности. Слизистая оболочка тонкая, блестящая, часто с усиленным сосудистым рисунком, микродиapedезными кровоизлияниями. Через эпителий в ряде случаев просвечивает прозрачная жидкость. По мере прогрессирования процесса образования становятся бугристыми и мутноватыми, но не теряют студенистости. При хронизации у больных развивается гипертрофия вестибулярных складок с формированием характерного тембра голоса. В абсолютном большинстве случаев патология двусторонняя [16, 23, 67].

При ларингостробоскопии регистрируют снижение амплитуды колебаний голосовых складок, локальное «выпадение» слизистой волны, неполное или нерегулярное смыкание, аperiодичные, асинхронные колебания, характерные «качающиеся» движения голосовых складок. Акустический анализ голоса показывает наличие высокого уровня шума, частотную и амплитудную нестабильность основного тона, смещение значений частоты основного тона в сторону низких частот [3, 27, 30, 36].

## **1.2 - Особенности микробиома гортани при экссудативных поражениях пространства Рейнке**

Исследованию нормального и патологического микробиома региона гортани посвящено немного работ, между тем именно гортань в силу особенностей анатомического расположения является органом, лимитирующим реализацию иммунологического компонента патогенеза

практически всех заболеваний респираторного тракта [53, 71, 93]. Описано множество факторов, способных влиять на состояние местной микробиоты гортани, в частности температурный режим, изменение кислотно-основного состояния, анаэриоз [79, 141], никотиновая интоксикация [179, 202], аллергические состояния [81], вокальные нагрузки [16, 28, 29, 179], гастроэзофагеальный рефлюкс [77, 100, 123, 202] и др. [196]. Компоненты табачного дыма могут оказывать селективное действие на аэробных представителей гортанной микробиоты, усиливать анаэриоз и увеличивать относительное количественное преимущество анаэробных таксонов [99, 142]. Сопутствующий курению кашель дополнительно механически повреждает ткани голосовых складок [119, 201]. Ряд авторов придает существенное значение нарушению качественного состава и соотношения различных представителей микробиоты гортани в формировании полипов голосовых складок, профессиональных вокальных узелков, кист гортани, отека Рейнке [56, 96, 142, 201].

Микробиом голосовых складок пациентов с ЭППР, страдающих гастроэзофагеальным рефлюксом, дополнительно содержит *Helicobacter pylori* в секрете [99]. Методом секвенирования в биопсийном материале гортани и голосовых складок определен спектр базового «набора» специфических бактериальных таксонов, основную массу которых составляют протеобактерии (38%), *Firmicutes* (34%), *Bacteroidetes* (19%), актинобактерии (7%) и фузобактерии (1%). При этом грамотрицательные аэробные протеобактерии *Comamonadaceae* составили 26,5%, неклассифицируемый стрептококк – 19%, далее по мере снижения процентной численности *Cloacibacterium* (10%), *Propionibacterium* (4,4%), *Helicobacter pylori* (3,6%), *Veillonella* (2,8%), *Acinetobacter* (2,6%), *Pseudomonas* (1,8%) [66, 79].

Гортанный микробиом курильщиков табака представлен в основном различными видами анаэробной флоры (стрептококка и вейлонеллы) [156].

Пациенты, длительно принимающие ингибиторы протонной помпы, имеют повышенные уровни *Cloacibacterium* в гортанном секрете [56, 156].

Экспериментально на модели гортани свиньи показано, что превентивная колонизация гортани стандартной бактериальной флорой приводит к незначительному увеличению экспрессии дендритных клеток, CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и Т-NK-лимфоцитов; напротив, введение патогенных стафилококков, являющихся комменсальной флорой свиней, приводит к выраженной миграции антигенпрезентирующих клеток (АПК) в зону микробной инвазии [188, 204]. Прогревание гортани и голосовых складок крыс сопровождается рекрутингом в ткани гранулоцитов, дендритных клеток и различных субпопуляций лимфоцитов. Эксперименты наглядно демонстрируют, что формирование иммунной архитектуры слизистой оболочки гортани зависит от взаимодействия с бактериями, факторами внешней среды, а состав бактериальной флоры, в свою очередь, может влиять на набор иммуноцитов в слизистой оболочке и тем самым существенно изменять иммунологическую среду гортани и голосовых складок [130].

Описано возраст-ассоциированное повышение числа CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в эпителии и собственной пластинке у курильщиков с полиповидной дегенерацией голосовых складок [77, 188, 204].

Экспериментально доказано усиление экспрессии 19 генов, в том числе генов молекул HLA-DRA, HLA DPB1, RFX5, на АПК при отеке Рейнке, позволяющих дифференцировать отек Рейнке и полипы голосовых складок [77].

### **1.3 – Значение мукозоассоциированной ткани региона гортани в развитии эксудативных поражений пространства Рейнке**

В силу анатомо-физиологических особенностей гортань подвергается действию большого количества ингаляционных раздражителей, активно участвует в реакциях иммунного реагирования [69, 205].

В слизистой оболочке 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, морфологически схожие с Пейеровыми бляшками [69, 139, 188, 204]. Подобно тонкому кишечнику, более 90 % популяции иммунных клеток гортани распределено диффузным образом по всему эпителию и собственной пластинке [188, 204]. В собственной пластинке subglottis описано максимальное количество CD8<sup>+</sup>-клеток, с высокой степенью экспрессии маркеров ранней активации CD25 (IL-2R) [177]. Описаны различия в экспрессии рецепторов системы HLA в клетках lamina propria разных участков гортани, наименьшее количество зафиксировано в тканях надгортанника [205]. В гортани плода человека дендритные клетки, Т-лимфоциты, В-лимфоциты и макрофаги присутствуют в желудочковых складках, subglottis и полностью отсутствуют в тканях голосовых складок [177]. Отмечено, что  $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты, так называемые интраэпителиальные лимфоциты, играют важную роль в локальных иммунных реакциях в коже и кишечнике и крайне редко обнаруживаются в лимфоидных скоплениях мукозоассоциированной ткани гортани [177]. Отмечено прогрессивное снижение плотности экспрессии антигена CD1d, представителя семейства трансмембранных гликопротеинов I типа, обладающего минимальным аллельным разнообразием, в тканях гортани по направлению к просвету органа [205]. Высокая плотность антигена CD1d в глубоких слоях обеспечивает высокую способность тканей гортани к сенситизации вирусными и бактериальными антигенами. Различия в степени выраженности экспрессии молекул HLA отражают уникальное свойство МАЛТ гортани – АПК-представляющую кластеризацию [205].

Отсутствие клинических или гистологических доказательств воспаления при формировании ЭППР на фоне высокого уровня экспрессии молекул HLA класса II в гортани связывают с наличием базового уровня провоспалительных цитокинов, в частности IFN- $\gamma$ , индуцированных наличием резидентной бактериальной флоры, характерной для биотопа гортани [185].

В то же время индукция толерантности к ряду индифферентных ингаляционных антигенов сопряжена с регулируемым понижением экспрессии CD80/CD86 на мембране профессиональных АПК [69].

Исследования субпопуляционного состава лимфоцитов гортани показали увеличение количества как Т-, так и В-клеток в собственной пластинке и почти полное отсутствие В-лимфоцитов в эпителиальном слое [209]. Несмотря на значительную межиндивидуальную вариабельность, данное исследование продемонстрировало преимущественную локализацию (CD8<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов в более глубоких слоях слизистой МАЛТ гортани. Авторы отмечают накопление CD3<sup>+</sup>CD16<sup>high</sup>CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов, определяющих фенотип природных Т- (Т-НК) клеток, в верхнем слое эпителия гортани [204]. Экспериментальная элиминация Т-НК-клеток у животных приводила к нарушению ауто толерантности и развитию опухолей гортани [209].

Фолликулярная составляющая МАЛТ региона гортани представлена преимущественно диффузно расположенными эпителиальными фолликулами [69].

Среди интраэпителиальных мононуклеарных клеток преобладали хелперы (CD4<sup>+</sup>); клетки супрессорно-цитотоксической субпопуляции (CD8<sup>+</sup>) отмечались преимущественно в образцах тканей с признаками вирусной инфекции. Лимфоциты с фенотипом В-клеток (CD20<sup>+</sup>, CD79a<sup>+</sup>) встречались в очаговых субэпителиальных скоплениях [67, 218].

Клетки базального и супрабазального слоев эпителия демонстрируют четкую цитоплазматическую экспрессию молекулы CD80 (B7-1) [67]. Молекула служит лигандом для модуляторов клеточного синапса на поверхности Т-клеток – CD28 и CTLA-4, связывание с которыми модулирует активность Т-лимфоцитов. Как отмечает Tan M. et al., CTLA-4 как интегральный мембранный белок в активированных В-лимфоцитах обеспечивает костимулирующий сигнал, необходимый для активации и выживания Т-лимфоцитов. Он конститутивно экспрессируется на

интердигитирующих активированных дендритных клетках, моноцитах, В-лимфоцитах и, вероятно, на других антигенпрезентирующих клетках [67]. Экспрессия молекулы CD80 (B7-1) на эпителиоцитах слизистой оболочки гортани при ЭППР, являющейся лигандом для рецепторов CD28 – индуктора позитивной стимуляции и CTLA-4, модулятора отрицательной регуляции и клеточной диссоциации, расположенных на Т-клетках, открывает новую грань функциональной значимости клеток эпителиального покрова в процессах эпителиально-стромальных взаимоотношений [8, 14].

«Заинтересованность» врожденных механизмов иммунитета в развитии ЭППР проявляется в виде мембранной экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 и эндосомальной экспрессии TLR9 эпителиоцитами базального и супрабазального слоев эпителиального покрова полипов голосовых складок [8].

По данным Быковой В.П. с соавт. [8, 14], повышение экспрессии TLR9 отмечено в образцах полипов голосовых складок с гистологическими признаками вирусной инфекции. Маркер клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68 выявлен на макрофагах, концентрирующихся вокруг отложений гемосидерина.

В тканях голосовых узелков и полипов голосовых складок описано повышение уровней индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и 3-нитротирозина (3-NT), более высоких в тканях полипов. Наблюдалась положительная корреляция между уровнем экспрессии iNOS и степенью образования 3-NT, позволяющая предположить патогенетическую роль данных метаболитов в патогенезе ЭППР [117].

Иммунохроматографическое определение уровня  $\beta$ -дефензина-1 человека (hBD-1) и  $\beta$ -дефензина-2 человека (hBD-2) в ЭППР голосовых складок продемонстрировало усиление экспрессии hBD-2 в эпителии полипов голосовых складок в сравнении с голосовыми узелками и здоровыми голосовыми складками [92].

С высокой степенью выраженности экспрессии TGF- $\beta$ 1 на иммунocyтaх полипов голосовых складок в сравнении со здоровыми голосовыми складками связывают развитие ремоделирующих изменений в тканях полипов, таких как накопление внеклеточного матрикса, формирование локального фиброза [201]. В работе Viebahn-Haensler R., et al., 2021г. [217] при формировании полипов голосовых складок выявлено повышение экспрессии большинства генов провоспалительных цитокинов – NF- $\kappa$ B (p65) и рецепторов pNF- $\kappa$ B (p65); продуктов регулируемого сигнального пути IL-6/JAK/STAT3, включая IL1R1, IL-6R, STAT3 и SOCS3. В то же время, в иммунных клетках и фибробластах эпителиального и субэпителиального слоев при отеке Рейнке отмечено увеличение внутриклеточного содержания IL-10 и белкового продукта гена 9,5 [PGP 9,5; убиквитин карбокси-терминальная гидролаза-1 (UCHL-1)], что, по мнению авторов (Копореска V., et al., 2021), указывает на доминирующий противовоспалительный ответ ткани, активацию процессов пролиферации и морфогенеза [80].

В работе Beasley D.E., et al. [48] имеются сведения об изменении индекса апоптоза/пролиферации в полипозно измененных тканях голосовых складок.

#### **1.4 – Морфофункциональный полиморфизм тканей голосовых складок при формировании экссудативных поражений пространства Рейнке**

Стойкий отек пространства Рейнке при формировании ЭППР напрямую указывает на недостаточность дренажной лимфатической системы мембранозной части голосовых складок, связанную с анатомическими особенностями пространства Рейнке. Свыше ста лет назад, в 1891 году, Hajek M. описал анатомию изолированного отека голосовых складок, который он, в честь анатома Reinke, назвал «отеком Рейнке» [144]. Hajek M. экспериментально осуществил модель отека голосовых складок, вводя под слизистую оболочку окрашенную желатину, и доказал, что отек локализован и имеет четкую верхнюю и нижнюю границу, которую он обозначил как *linea*

*arcuata superior et interior*, соответствующую месту начала многослойного мерцательного эпителия. Пространство между областью внутреннего края голосовых и вестибулярных складок получило название «пространства Рейнке» [95].

Морфологической основой всех ЭППР является локальный отек, обусловленный повышенной проницаемостью стенок мелких сосудов и расстройством местной микроциркуляции. В основе микроциркуляторных расстройств при ЭППР лежит повреждение сосудистой стенки гипоксическим ишемическим генеза, обусловленное хронической фонотравмой, чаще всего в сочетании с интоксикацией. Морфологические исследования тканей голосовых складок пациентов с ЭППР демонстрируют повышенную субэпителиальную васкуляризацию с большим количеством расширенных, ломких, с истонченными стенками капилляров пространства Рейнке, реактивную трансформацию эпителия в виде гиперкератоза, появления слоя кератогиалина с наличием выраженного отека стромы на фоне немногочисленных расширенных мелких сосудов, переполненных отечной жидкостью, содержащей лимфоидные клетки. В рыхлой соединительной ткани описаны очаги формирования соединительнотканых тяжей, очагового склероза и лимфостаза [8, 14]. В ряде случаев обнаружены субэпидермальные и интраэпидермальные пузыри, заполненные прозрачным содержимым, в сочетании с койлоцитарной трансформацией клеток, что указывает на вирусную инвазию тканей голосовых складок [8, 14].

Несмотря на общность морфофункциональных изменений при формировании ЭППР, выраженность которых индивидуально варьирует, на основании преобладания тех или иных морфологических признаков полипы голосовых складок подразделяют на две подгруппы: отечные, или миксоидные, полипы и ангиоматозные полипы [8, 9, 14].

Лимфодренаж гортани сложен, что отражает различное эмбриональное происхождение надгортанника и зоны *subglottis* [77]. Koufman J.A., et al. полагают, что лимфоидные клетки гортани мигрируют в глубокую шейную

цепь лимфатических узлов [123]. Скоплению отечной жидкости в рыхлой соединительной ткани пространства Рейнке способствует недостаточность отведения тканевой жидкости по слабо развитым лимфатическим коллекторам [67, 219]. Пути оттока лимфы от пространства Рейнке должны преодолеть более плотные ткани голосовой складки и голосовой мышцы, а также «обогнуть» пластинки щитовидного хряща, чтобы соединиться с лимфатическими сосудами под- и надскладочного отделов слизистой оболочки гортани. Детекция маркера эндотелиальных клеток CD34<sup>+</sup> позволила визуализировать очертания кровеносного микроциркуляторного русла и лимфатических сосудов с явлениями лимфостаза и отличать их от искусственных «структур» интерстициального отека в виде щелей, полостей, «озер», образованных разволокнением и расхождением коллагеновых и ретикулярных волокон под давлением отечной жидкости. Отсутствие экспрессии CD34<sup>+</sup> по контуру лимфатического «озера» свидетельствовало в пользу интерстициального отека с выраженной дезорганизацией соединительнотканного матрикса [8, 14]. Иммуногистохимическое фенотипирование эффекторных клеток воспалительного инфильтрата (CD3, CD79a, CD68) полипов и изучение характера тканевой жидкости подтверждают серозный характер воспаления, указывают на экссудативную природу патологии, а продуктивный компонент в наблюдениях Martins R.H., et al. отражает явления организации очагов кровоизлияний в ангиоматозных полипах [218].

По мнению Зориной А.И. с соавт. [33], особого внимания в структуре полипов голосовых складок у курильщиков или лиц, постоянно контактирующих с токсическими веществами, заслуживает оценка состояния покровного многослойного плоского неороговевающего эпителия, изменяющегося в результате гиперплазии эпителиоцитов и развития патологического ороговения в форме гипер- и паракератоза с появлением зернистого слоя клеток, содержащих кератогиалин.

В формировании нарушений микроциркуляции в тканях полипов, неизбежно ведущих к гипоксии, дистрофии тканей и, следовательно, к формированию фиброза, особую роль играют матриксные металлопротеиназы (ММП), отвечающие за процессы ремоделирования соединительнотканного матрикса [8, 12, 14]. ММП-9 относится ко второму подсемейству матриксинов, синтезируется в нейтрофилах, макрофагах, фибробластах, хондроцитах и Т-лимфоцитах после стимуляции их цитокинами, является мощным фактором дезорганизации межклеточного матрикса, обладает способностью разрушать трехспиральные структуры коллагена IV и V типов, которые являются основой базальных мембран эпителия и эндотелиальной выстилки микрососудов, следовательно, активность ММП-9 рассматривается как один из ведущих факторов ангиогенеза, регулятор проницаемости базальных мембран для жидкостных и форменных элементов крови, лимфы и перемещения тканевой жидкости [12].

Не исключено, что картина редуцированного серозного воспаления (серозный отек с минимумом нейтрофильных лейкоцитов или их отсутствием), наблюдаемая при полипозе голосовых складок, является результатом антицитокиновой активности ММП [12].

Накоплен большой объем информации о функции фибробластов внеклеточного матрикса тканей ЭППР, белка фибронектина, способного накапливаться в тканях голосовых узелков, ангиоматозных полипов [2].

Установлено повышение экспрессии в тканях полипов ангиоматозного типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), регулирующего процесс неоангиогенеза [88].

Исследование внеклеточного матрикса собственной пластинки при ЭППР, проведенное Thibeault S.L. et al., продемонстрировало усиление экспрессии белков внеклеточного матрикса: проколлагена I, коллагеназы, эластазы, фибронектина, фибромодулина, декорина, синтазы гиалуроновой кислоты 2 и гиалуронидазы [91].

Обработка культуры фибробластов, выделенных из тканей голосовых складок пациентов с отеком Рейнке, экстрактом сигаретного дыма в течение 24 часов показала увеличение экспрессии генов метаболизма ксенобиотиков, усиление реакций свободнорадикального окисления, повышенный синтез фибриллярных коллагенов (COL1A1 и COL1A2), УДФ-глюкозо-6-дегидрогеназы [178].

В тканях полипозно измененных голосовых складок доказано увеличение экспрессии EGFR, циклина D1, p53, Ki-67 и IMP3 ИНС [103].

### **1.5 – Современные принципы терапии экссудативных поражений пространства Рейнке и перспективные направления коррекции**

Современные подходы к терапии ЭППР имеют персонализированный характер, зависящий от особенностей течения процесса, длительности заболевания, состояния врожденных и приобретенных механизмов иммунной защиты органа, эндоскопической картины, а также эффективности проводимого ранее консервативного лечения. Ряд авторов придает большое значение терапии сопутствующей патологии верхних и нижних дыхательных путей, фаринголарингеального рефлюкса, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, системной и локальной коррекции иммунных нарушений, гормонального фона [21, 36, 42]. Рекомендуются восстановление носового дыхания, санация очагов инфекции, ПЦР-диагностика инфицирования вирусами герпетической группы. В то же время некоторые исследователи отмечают низкую комплаентность пациентов, что следует учитывать при назначении терапии [27, 28].

Комплексное консервативное лечение обязательно включает фонопедическую коррекцию голосообразования, эффективность которой при ЭППР доказана в многочисленных исследованиях [17, 28, 29, 36, 157]. Отмечена эффективность сочетанного введения гормональных препаратов непосредственно в ткань образования одновременно с проведением фонопедической коррекции [84]. При легких, начальных формах отека Рейнке,



когда имеется лишь небольшая отечность голосовых складок, рекомендуются ингаляции с кортикостероидами, прием внутрь антигистаминных, ферментных препаратов, электрофорез 1 % йодида калия, лидазы, хлористого кальция 2–5 % на область гортани, низкоинтенсивная лазеротерапия, микроволновое лечение, фонофорез со стероидсодержащими мазями [21, 77]. Антибактериальная терапия применяется редко в виде инстилляций при наличии выраженного воспалительного процесса в области голосовых складок [21, 68].

При значительной выраженности полипозной дегенерации, рецидивирующем характере заболевания, дыхательных расстройствах прибегают к хирургическому лечению. Любое хирургическое вмешательство сопровождается развитием раневого процесса, исход которого зависит не только от квалификации хирурга, но и от состояния локального иммунитета гортани, базового набора микрофлоры и ее видового состава, общего состояния организма. Чаще проводится декорткация голосовых складок по Kleinsasser под контролем интраоперационной микроларингостробоскопии. Популярной является методика Hirano (1983), суть которой состоит в проведении разреза вдоль латерального края голосовых складок с аспирацией студенистой массы, иссечением избыточной эпителиальной ткани [101]. Широко используются современные малоинвазивные технологии микрохирургического вмешательства, лазерные методики, радиохирургический метод, реализующий щадящий механизм воздействия на биологические ткани [84, 175]. Послеоперационное лечение, как правило, включает препараты местного действия с обезболивающими, противовоспалительными, антимикробными и кератопластическими свойствами [21].

К послеоперационным осложнениям можно отнести рубцовую деформацию голосовых складок, формирование синехий, причинами которых могут быть избыточное удаление слизистой голосовых складок, выполнение грубых манипуляций в комиссуре гортани, проведение операции на фоне

обострения хронического воспалительного процесса, сопутствующие заболевания (вирусные гепатиты, сахарный диабет, ГЭРБ, хронический бронхит, гипотиреоз), отсутствие послеоперационной терапии, большая длительность заболевания с формированием ложноскладковой фонации, сочетание органической патологии с функциональными расстройствами голосовой функции [21]. Возможность развития функциональных и органических осложнений послеоперационного периода, высокая социально-профессиональная значимость патологии, длительная фонопедическая реабилитация диктуют необходимость поиска актуальных терапевтических подходов к ведению именно раннего послеоперационного периода для максимально полного восстановления голосообразующей функции и пригодности голосового аппарата к дальнейшей профессиональной деятельности. Современные исследования доказывают вовлеченность структур мукозоассоциированной лимфоидной ткани гортани (МАЛТ) в патогенез ЭППР, следовательно, состояние локального иммунитета является важнейшим лимитирующим механизмом запуска реакций иммунного реагирования и во многом определяет эффективность проводимой послеоперационной терапии.

Одним из патогенетически обоснованных методов терапии, направленных на купирование воспалительных явлений в ране, коррекцию репаративных процессов, управление редокс-статусом клетки, может являться применение локальной озонотерапии в раннем послеоперационном периоде.

Мультимодальные свойства медицинского озона обуславливают положительное системное воздействие на функционирование ключевых гомеостатических систем и локальное, включающее бактерицидный, фунгицидный, вирулицидный, противовоспалительный, антигипоксический и иммунокорректирующий эффекты, многократно подтвержденные клиническими и экспериментальными наблюдениями [11, 18, 31, 39, 44, 45, 50, 55, 60-64, 74, 76, 82, 85, 94, 104, 108, 110, 111, 124, 127, 130, 131, 160-164, 167, 172, 173, 195, 198, 207, 210, 225].

В экспериментах *in vitro* и клинических условиях установлено, что газообразный озон в концентрациях от 1 до 5 мг/л оказывает губительное воздействие практически на все виды грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусы, грибки и простейшие [39, 120]. Механизм инактивации вирусных частиц исследователи объясняют частичным разрушением оболочки вируса, активацией ферментативного аппарата, ингибированием процесса транскрипции и трансляции и нарушением способности вирусов соединяться с рецепторами клеточных мишеней [57, 86].

Поступление озона в организм приводит к эскалации умеренного окислительного стресса за счет взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) и водой, усиления образования активных форм кислорода (АФК), изопростанов, озонидов. Бактерицидный эффект озонированного растительного масла обусловлен наличием озонидов, образующихся в реакциях озона по месту расположения двойных связей в жирной кислоте. В силу наличия кислородной связи молекула озонид – ненасыщенной жирной кислоты прикрепляется к рецептору для микроорганизмов и блокирует его. Наибольшим бактерицидным эффектом обладает масло с пероксидным числом 2,5–3 тысячи [10, 24].

При разведении масляного раствора в 10, 20, 50 и 100 раз сохраняется стерилизующий эффект в отношении микроорганизмов *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *M. cfnis*, плесневых и дрожжеподобных грибков рода *Candida*. Терапевтическая эффективность озонированного масла доказана при лечении хронического аденоидита [39].

Воздействие низких концентраций  $O_3$  на систему крови и клетки эндотелия приводит к активации редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, дозозависимо индуцирует экспрессию гемоксигеназы 1 (*HMOX1*) и  $Na^+$ -транслоцирующей NADH: хиноноксидоредуктазы (NQO2) [151]. Известно, что NQO2 контролирует стабильность p53 в клетках, что играет важную роль в регуляции роста, пролиферации и ответа клеток

на оксидативный стресс, участвует в регуляции ключевых транскрипционных факторов С/ЕВР- $\alpha$  и киназы АКТ1 [147].

Системное введение низких терапевтических доз  $O_3$  здоровым лицам увеличивает уровни Nrf2 в мононуклеарных клетках периферической крови с последующим усилением внутриклеточной активности СОД, каталазы и других ферментов антиоксидантной защиты [114]. Применение озонированного физиологического раствора в модели заживления ран на кератиноцитах человека *in vitro* продемонстрировало активацию Nrf2, приводящую к увеличению экспрессии гена гемоксигеназы 1 (*HMOX1*) [213]. Системное введение озона крысам с аденин-индуцированным хроническим заболеванием почек приводило к ингибированию пути NF- $\kappa$ B и активации Nrf2, что проявлялось повышением уровня антиоксидантных ферментов, снижением уровня провоспалительных цитокинов в почках с редукцией проявлений почечной недостаточности [168]. Ректальное введение  $O_3$  пациентам с рассеянным склерозом сопровождалось увеличением фосфорилирования Nrf2 и экспрессией казеинкиназы 2 (СК2) в мононуклеарных клетках [134]. Применение озонированного физиологического раствора при стрептозоцин-опосредованном панкреатите у крыс приводило к увеличению уровня эндогенного Nrf2 и глутатион-S-трансферазы (GST) в тканях органа [112].

Представляет интерес применение озонотерапии при сосудистой патологии. Так, системное введение озонированного физиологического раствора крысам способствовало запуску окислительного прекондиционирования путем активации Nrf2, что защищало легкие и миокард от ишемически-реперфузионного повреждения, основной причины сердечной и дыхательной дисфункции во время сердечно-сосудистых операций, трансплантации сердца и процедур искусственного кровообращения [166, 222]. Использование озонотерапии в лечении диабетических осложнений продемонстрировало выраженный антигипоксический эффект в виде активации синтеза индуцируемого

гипоксией фактора  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ), семейства факторов транскрипции NFAT (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, NFAT5) [138, 207, 212]. Nrf2 был впервые выделен в 1994 году, идентифицирован как член семейства транскрипционных факторов с доменом CNC (cap'n'collar) основной лейциновой молнии (bzip – basic zipper) и назван по сходству с основным регулятором этого локуса – NF-E2 (Nrf2 – NF-E2 related factor 2) [90, 143, 152, 212]. В клетках Nrf2 находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1 (Kelch-like ECH associating protein 1), являющегося молекулярным «сенсором» изменения внутриклеточного гомеостаза. Неразрывная связь этих молекулярных структур объединяет их в единую редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. ARE контролирует экспрессию более 200 генов, среди которых гены антиоксидантных ферментов (гемоксигеназа 1, глутатионпероксидаза 2, глутаматцистеинлигаза, глутатионредуктаза, тиоредоксинредуктаза и др.) и ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков (глутатион-8-трансферазы А, М, Р, NAD(P)H: хиноноксидоредуктаза 1, NRH: хиноноксидоредуктаза 2, УДФ-глюкуронозилтрансферазы А и В и др.) [90, 143, 208].

Идентифицированы гены ARE, участвующие в основных биологических процессах клетки, включая протеомный гомеостаз, детоксикацию, репарацию ДНК, пролиферацию, аутофагию, митохондриальный биогенез, метаболизм липидов, углеводов и аминокислот [149, 183]. Системное введение озона способно посредством Nrf2 оказывать влияние на транскриптом клетки через взаимодействие последнего с другими факторами транскрипции, такими как Notch1 [183], арилуглеводородный рецептор (AhR), ССААТ/энхансер-связывающий белок (С/ЕВРВ), гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR $\gamma$ ), альфа-рецептор ретиноида X (RXRA) и NF- $\kappa$ B [113, 136, 148, 154].

Влияние озона на Nrf2 предотвращает окислительный стресс, вызванный оперативным вмешательством, стрессорным воздействием, травмой, посредством транскрипции антиоксидантных ферментов, таких как каталитические и модуляторные субъединицы глутаматцистеинлигазы (GCL), глутатионпероксидазы (GPX2 и GPX4), глутатионредуктазы (GSR), пероксиредоксинов (PRDX1 и PRDX6), тиоредоксин 1 и тиоредоксинредуктаза 1 (TXN1 и TXNRD1), HMOX1 и биливердинредуктаза (BVR) [54, 102, 153, 155, 211]. Введение низких доз озона индуцирует модуляцию генов, участвующих в клеточном ответе на стресс (*HMOX1*; группа кросс-комплементации 4 эксцизионной репарации, *ERCC4*; ингибитор циклинзависимой киназы 1A, *CDKN1A*), и в механизме транскрипции (CTD малая фосфатаза 1, *CTDSP1*) [83].

Доказано, что обработка раневой поверхности озонированным растительным маслом способствует сокращению сроков репарации за счет увеличения миграции фибробластов, реализуемой через сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) / протеинкиназа B (Akt) / mTOR [47, 187], увеличения степени аутофагии в ране и посредством активации AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) / mTOR [190].

Некоторые исследователи считают, что поддержание эффективной функции митохондрий и координации путей передачи сигналов между органеллами (митохондриальный ретроградный ответ) для сохранения клеточного гомеостаза модулируется индукцией умеренного митохондриального стресса (митогормезиса) [65, 144, 145]. Горметическое действие озона, использованное для коррекции кардиальных митохондриальных дисфункций, проявляется в виде активации биогенеза митохондрий посредством запуска ядерного респираторного фактора-1 (NRF-1) в кардиомиоцитах [65, 76, 145]. Nrf2 функционально связан с Sqstm1/p62, локализующимся в митохондриях и усиливающим митохондриальный фактор транскрипции A (TFAM) – основной регулятор митохондриального биогенеза, индуцированного ацетилкарнитином (ALCAR), оксидом азота (NO) и

ресвератролом [86, 87, 145]. Было обнаружено, что низкие дозы озона увеличивают длину митохондриальных крист, содержание митохондриального белка теплового шока 70 и снижают риск реперфузионной ишемии миокарда у крыс [65, 145].

Противовоспалительное действие озона модулируется путем запуска в клетке ряда механизмов: регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза, подавления активности провоспалительных генов (NF-κB), подавления участия РНК-полимеразы II в транскрипции генов провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1β [73, 163, 199, 200].

Выявлено, что разнонаправленный гомеостатический озон-индуцированный контроль за активностью Nrf2 и NF-κB может способствовать увеличению продолжительности жизни организма, поскольку набор генов, контролируемых NF-κB, тесно связан с мишенями транскрипционных/эпигенетических регуляторов, в частности, сиртуинов, связанных с лимитированием продолжительности жизни организма [150], а озонотерапия рассматривается как один из потенциальных инструментов для предотвращения преждевременного старения.

Представляют интерес данные о влиянии озона на процессы адипогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток [192] во взаимосвязи с геном гемоксигеназы 1 (*HMOX1*) [121]. Kim B.R., et al. в 2018 году проанализировали влияние озона на механизмы развития жировой ткани на клетках линии 3 T3-L1, являющихся модельной *in vitro* системой для изучения трансформации мезенхимальных стволовых клеток в преадипоциты и далее в адипоциты, показало, что озон посредством прямого взаимодействия с Nrf2 позитивно влияет на дифференцировку адипоцитов, модулируя экспрессию фактора роста фибробластов 21 (FGF21) через PPARγ [192].

Таким образом, анализ современной медицинской литературы за последние 5–10 лет показал, что формирование и лечение экссудативных поражений пространства Рейнке является актуальной медико-социальной

проблемой, требующей комплексного подхода как к изучению и анализу этиологических факторов и аспектов патогенеза, так и к разработке патогенетически обоснованных подходов к применению методов и средств восстановительной терапии, направленных на максимально полное восстановление голосообразовательной функции. В основе патогенеза ЭППР лежат особенности лимфодренажной системы голосовых складок и гортани, заключающиеся в сложности оттока лимфы в условиях хронических перегрузок голосового аппарата и/или воздействия токсических раздражителей; однако лимитирующую роль в реакциях иммунного реагирования играют компоненты МАЛТ региона гортани, участвующие не только в формировании особой иммунной архитектоники тканей в условиях развития патологии, но и принимающие непосредственное участие в процессах репарации тканей, ремоделинге, эпителиально-стромальных взаимоотношениях, модуляции редокс-статуса клетки. Одним из патогенетически обоснованных факторов модуляции воспалительного процесса, иммунного и редокс-статуса клетки, репаративных процессов в послеоперационном периоде хирургического лечения ЭППР может выступать озонотерапия, эффективность которой продемонстрирована на многочисленных экспериментальных моделях и клинических примерах.



## ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **2.1 – Материалы исследования. Общая характеристика обследованных больных**

Настоящее исследование проведено на базе оториноларингологических отделений ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» (г. Челябинск) и филиала № 3 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий им. А.А. Вишневого» Министерства обороны России (г. Одинцово) с 2019 по 2022 год, а также лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) с соблюдением этических принципов, изложенных в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) последнего пересмотра (Токио, 2010), с учетом примечаний к параграфу 29, внесенных Генеральной ассамблеей ВМА (Вашингтон, 2002, поправки от 2011 года); в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266; одобрено решением этического комитета 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 исследовании принимали участие 92 человека, из них основную группу (2) составили 72 пациента обоего пола от 25 до 55 лет с различными формами экссудативного поражения пространства Рейнке (ЭППР). Все пациенты поступали на оперативное лечение в отделения оториноларингологии с 2019 по 2022 год. 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%).

Критериями включения в исследование являлись:

- наличие гистологически верифицированного варианта ЭППР, требующего хирургического лечения.

Критерии исключения:

- наличие иной патологии лор-органов;
- подозрение на злокачественный процесс области исследования или любой иной локализации;
- иммунодефицитные состояния и лимфопролиферативные заболевания, аутоиммунная патология;
- соматическая патология в стадии декомпенсации;
- психические заболевания;
- острые респираторные вирусные заболевания.

В контрольную группу (1) вошли 20 практически здоровых лиц (8 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 25 до 55 лет без патологии лор-органов. Средний возраст лиц контрольной группы составил  $(42,0 \pm 2,8)$  года.

Все пациенты, включенные в основную и контрольную группы, заполняли форму добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Средняя длительность заболевания у пациентов основной группы составляла  $2,5 \pm 0,6$  года. Возрастные и гендерные особенности пациентов с ЭППР представлены в *таблице 1*. Среди обследованных пациентов с полипами голосовых складок отмечено количественное преобладание лиц женского пола – 28 (70,0%) над пациентами мужского пола – 12 (30,0%), что согласуется с литературными данными [9, 16, 27]. Напротив, среди пациентов с отеком Рейнке чаще встречались лица мужского пола. В группе пациентов с голосовыми узелками гендерных различий не наблюдалось.

Средний возраст пациентов с ЭППР, входящих в исследование, составил  $40,0 \pm 2,9$  года и не имел значимых различий с группой контроля.

**Таблица 1 – Распределение пациентов основной группы с ЭППР по возрасту и полу**

Патология	Возраст пациентов, лет													
	25–35				36–45				46–55				Всего	
	Мужчины		Женщины		Мужчины		Женщины		Мужчины		Женщины			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Полипы голосовых складок	4	10,0	6	15,0	6	15,0	18	45,0	2	5,0	4	10,0	40	100
Голосовые узелки	1	7,7	4	30,8	4	30,8	2	15,4	1	7,7	1	7,7	13	
Отек Рейнке	3	15,8	2	10,5	7	36,8	3	15,8	3	15,8	1	5,3	19	

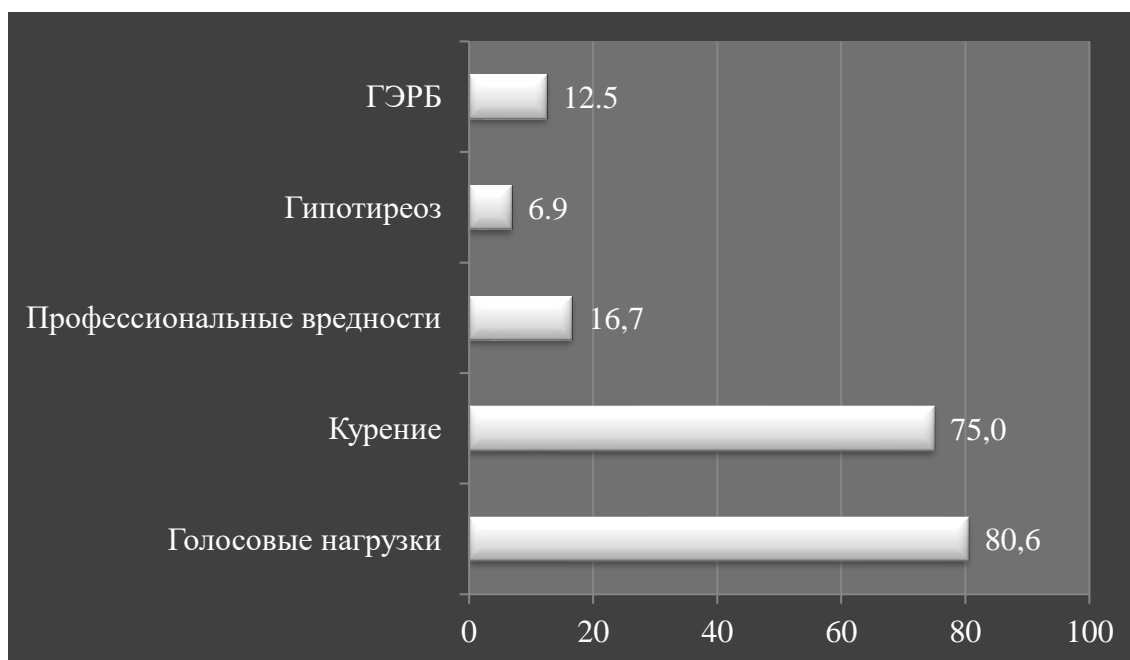
Группы были сопоставимы по возрастным характеристикам и наличию сопутствующей соматической патологии вне обострения (таблица 2), что отвечает требованиям исследования по сопоставимости групп.

**Таблица 2 – Характеристика сопутствующей патологии (вне обострения) контрольной и основной групп**

Показатели	Здоровые n = 20	Пациенты с ЭППР n = 72	Fisher exact, p
Гипертоническая болезнь I, II степени	3	4	0,17
Патология щитовидной железы	2	7	0,62
Хроническая обструктивная болезнь легких	1	3	0,63
Бронхиальная астма	1	3	0,63
Хронический пиелонефрит	2	4	0,38
Хронический гастрит	5	8	0,11
Сахарный диабет 2-го типа	1	7	0,40
Аллергические заболевания	4	6	0,14

*Примечание: данные представлены в абсолютных значениях; межгрупповые сопоставления проведены с использованием точного критерия Фишера (для номинальных показателей); значимыми считались различия при уровне  $p < 0,05$ .*

Анамнестические данные свидетельствуют о наличии у пациентов основной группы следующих факторов риска (*рисунок 1*):

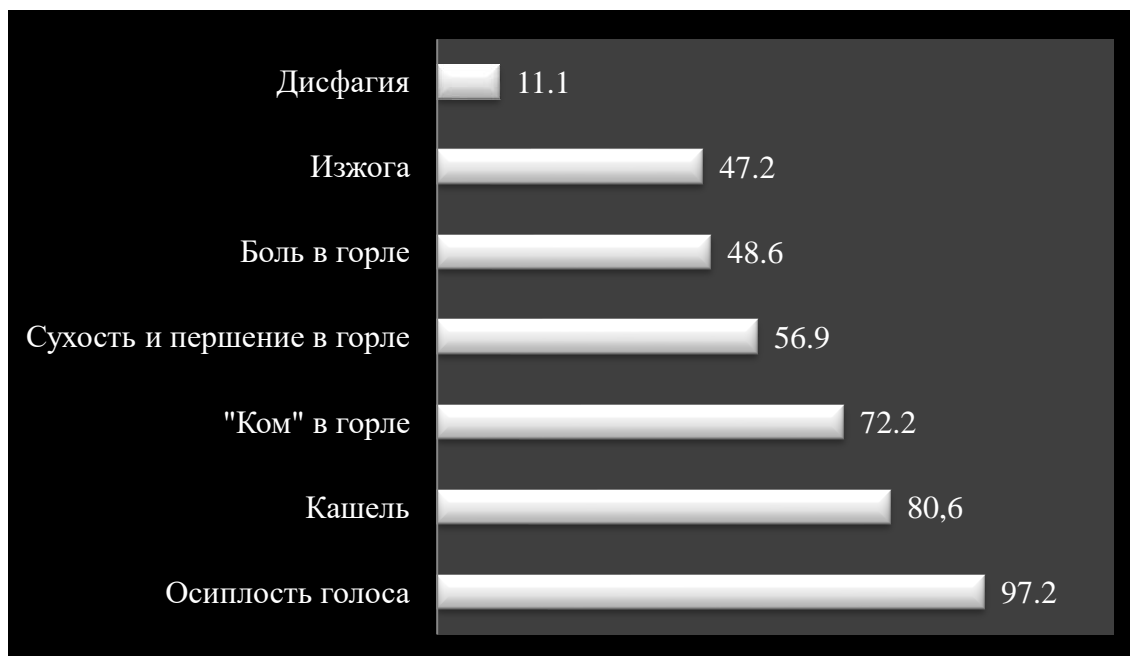


**Рисунок 1 – Факторы риска развития ЭППР (%)**

Как видно из рисунка 1, основными факторами риска развития ЭППР являются интенсивные и постоянные голосовые нагрузки ( $n=58$ ) и курение ( $n=54$ ). Профессиональные вредности, связанные с воздействием токсических раздражителей, высокой температуры, пыли, имели этиологическое значение у 12 пациентов. Наличие гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) с высокой кислотообразующей функцией желудка и клинически выраженного гипотиреоза отмечали чуть более 19% пациентов.

Анализ жалоб пациентов с ЭППР, представленных на *рисунке 2*, показал, что подавляющее большинство пациентов предъявляли жалобы на осиплость голоса ( $n=70$ ), кашель ( $n=58$ ), чаще приступообразный непродуктивный с небольшим количеством слизистой или слизисто-гноющей мокроты, усиливающийся в горизонтальном положении. У ряда пациентов явления дисфонии уменьшались после откашливания. Ощущение «инородного тела», «кома» в горле наблюдалось более чем у 70% больных с ЭППР. Более половины пациентов ( $n=41$ ) жаловались на сухость и першение в горле, чуть реже больных беспокоили боли в горле ( $n=35$ ), не связанные

с острыми респираторными заболеваниями. На изжогу и дисфагию, чаще при обострении патологии желудочно-кишечного тракта, связанной с рефлюксными состояниями, жаловались 47,2 и 11,1% обследуемых соответственно.



**Рисунок 2 – Основные жалобы пациентов с ЭППР (%)**

Согласно клиническим рекомендациям Национальной медицинской ассоциации оториноларингологов по лечению доброкачественных опухолеподобных заболеваний гортани и голосовых складок (2016), целью стационарного этапа лечения является проведение хирургического вмешательства в виде удаления образований «холодным» инструментом или с использованием различного типа лазеров (диодных, CO<sub>2</sub>, PDL и KTP, NdYag). Дальнейшее консервативное послеоперационное лечение направлено на купирование воспалительного процесса, стимуляцию репаративных процессов в ране (реэпителизацию голосовых складок), восстановление фонаторной функции. В качестве базисных мероприятий рекомендуется ограничение голосовой нагрузки, запрет на использование шепотной речи. Однако физиотерапевтическим методам послеоперационной терапии отводится ведущая роль в решении обозначенных задач. Ингаляционное или эндоларингеальное введение лекарственных препаратов являются

предпочтительными способами доставки лекарственной субстанции. Выбор топической озонотерапии в виде эндоларингеальной аппликации озонированного растительного масла на область голосовых складок в раннем послеоперационном периоде в качестве основного и/или дополнительного физиотерапевтического метода воздействия обусловлен мультимодальными свойствами озона, малотравматичностью, доступностью, минимумом противопоказаний. Согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 13.10.2017 № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг», озонотерапии отведена отдельная рубрика А20.30.024.

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 «Альбеда ИН7», целью которой было увлажнение раневой поверхности голосовых складок; в подгруппу 2б (n=36) включили пациентов, которым, помимо стандартной терапии, начиная со второго дня послеоперационного периода проводилась локальная озонотерапия.

Хирургическое удаление полипозно измененной слизистой оболочки голосовых складок пациентам основной группы выполнялось на вторые сутки поступления в стационар с помощью фибробронхоскопа Olympus TYPPEP150 (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 полипозно измененные голосовые складки. Микроинструментом и CO<sub>2</sub>

лазером в режиме повторяющихся импульсов мощностью 4 Вт с интервалом 0,05 с выполнялось продольное рассеечение слизистой голосовой складки по методу Hirano M. [101], удалялись фрагменты патологически измененных тканей. Микроаспиратором удаляли новообразования пространства Рейнке. Раневая поверхность голосовых складок пластирована слизистым лоскутом с фиксацией фибриновым клеем.

Пациентам подгруппы 2б дополнительно к стандартной терапии (ингаляции 0,9% физиологическим раствором) со вторых суток после операции 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.

## **2.2 – Методы исследования**

Общий перечень проводимых обследований для всех групп пациентов представлен в *таблице 3*.

**Таблица 3 – Перечень обследований, выполняемых в зависимости от группы объектов исследования, и сроки их проведения**

Обследование	Группы исследования и сроки проведения		
	Группа 1 Здоровые лица n = 20	Группа 2 Пациенты с ЭППР n = 72	
		Подгруппа 2а Стандарт. терапия n = 36	Подгруппа 2б Стандарт. терапия + озон n = 36
Клинический осмотр	Однократно при заборе материала	При поступлении; 2–10-е сутки – ежедневно	
Сбор анамнеза (жалобы, сопутствующая патология, профессиональный маршрут)	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 (после операции)	1-е сутки (до операции); 7, 10-е сутки (после операции)
Гистологические, морфометрические иммуногистохимические, иммунологические, биохимические исследования	–	Биопсийный материал	

### 2.2.1 – Клинико-anamнестические методы исследования

Проводили **сбор анамнеза**, включающий оценку жалоб, первичный скрининг этиологических факторов, оценку длительности заболевания, частоты рецидивов, голосового расстройства, сопутствующей соматической патологии. При необходимости выполняли исследование функции внешнего дыхания, фиброгастродуоденоскопию, ультразвуковое исследование с функциональными пробами, рентгенографию пищевода и желудка,



микроскопию и посев мокроты, консультации невролога, гастроэнтеролога, пульмонолога или эндокринолога.

#### **Оценка интенсивности боли по визуально-аналоговой шкале.**

Для оценки интенсивности болевых ощущений использовали визуально-аналоговую шкалу – ВАШ (Visual Analog Scale, VAS), предполагающую определение ассоциации выраженности боли с длиной отрезка, имеющего градуировку от 1 до 10 баллов, соответствующую полярным точкам «боли нет» и «невыносимая или максимальная боль». Пациенту предлагалось сделать на этой линии отметку, соответствующую интенсивности испытываемых им в данный момент болей. Интенсивность болевых ощущений помогали оценить пояснения, написанные вдоль линии отрезка: «нет болей», «слабые», «умеренные», «тяжелые». Использована следующая градация интенсивности болевых ощущений: слабая боль – 1–4 балла, умеренная боль – 5–6 баллов, сильная боль – 7–10 баллов.

#### **Акустические исследования**

*Исследование качества голоса* проводили совместно с фониатром и фонопедом центра оториноларингологии при МАУЗ ГКБ № 1 (г. Челябинск) с использованием 5-балльной шкалы Yanagihara [218] в ходе беседы с пациентом или прочтения им небольшого текста в течение 10–15 минут. Субъективную оценку качества голоса проводили следующим образом: 0 – нормальный голос; 1 – глухой голос; 2 – легкая степень охриплости; 3 – средняя степень охриплости; 4 – тяжелая степень охриплости; 5 – афония.

*Время максимальной фонации (ВМФ)* звука «А» оценивали перед операцией, на 3, 7, 10-е сутки после операции, в трех пробах, вычисляя среднее арифметическое значение. Нормальные показатели ВМФ для женщин составляют в среднем  $17,4 \pm 2,9$  сек., для мужчин –  $30,4 \pm 3,3$  сек. [4, 36].

### **2.2.2 – Клинико-функциональная диагностика экссудативных поражений пространства Рейнке**

**Непрямую микроларингоскопию** проводили с помощью гортанных зеркал диаметром 22, 25, 30 мм. Осматривали свободный край надгортанника, гортанную и язычную поверхности надгортанника, язычно-надгортанную складку, корень языка, грушевидные синусы, черпаловидную область, черпало-надгортанные складки, истинные и ложные голосовые складки, переднюю комиссуру, межчерпаловидное и подскладковое пространство. Оценивали симметричность гортани и грушевидных синусов, форму голосовой щели и активную подвижность структур гортани.

**Видеофибrolарингоскопия** проводилась интраоперационно с помощью фибробронхоскопа Olympus TYPPEP150 (Япония) на эндоскопических стойках модели 150 и 180 с визуализацией на широкоформатном мониторе. Предварительно проводили анестезию 2% раствором лидокаина. Осматривали детально все отделы гортани, Морганиевы карманы, подголосовой отдел, верхнюю треть трахеи.

### **2.2.3 – Биохимические исследования**

Для оценки **содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)** в слизистом отделяемом голосовых складок использовали экстракционно-спектрофотометрический метод определения продуктов ПОЛ по методике И.А. Волчегорского и соавторов [5, 25]. Согласно методике, к 0,5 мл гомогенизированной слизи голосовых складок добавляли 5 мл смеси гептан – изопропанол (1:1), встряхивали в закрытых пробирках 15 минут и производили экстракцию в течение 20 минут, затем центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин, липидные экстракты сливали и разбавляли 5 мл смеси гептан – изопропанол (3:7 по объему). К разбавленным липидным экстрактам добавляли водный раствор соляной кислоты (рН 2,0) в объеме 2 мл для разделения фаз и отмывки от нелипидных примесей. После разделения смеси на фазы гептановую фазу отбирали в отдельную сухую

пробирку, а к водно-спиртовой фазе добавляли 1 г сухого NaCl для обезвоживания изопропанольного экстракта. После отделения водной фазы изопропанол переносили в отдельную пробирку. Оптические контроли готовили путем экстракции по аналогичной схеме, заменив исследуемый образец эквивалентным количеством 0,1 % раствора ЭДТА на 0,9 % NaCl. Измеряли оптическую плотность каждой фазы против соответствующего контроля при 220 нм (поглощение монохроматического света экстрактом в диапазоне 186–225 нм отражает содержание изолированных двойных связей), 232 нм (поглощение в диапазоне 225–230 нм отражает содержание диеновых конъюгатов), 278 нм (поглощение напрямую зависит от содержания кетодиенов и сопряженных триенов). Конечные продукты ПОЛ (основания Шиффа) определяли путем дополнительного замера оптической плотности экстракта при 400 нм. Расчет содержания продуктов ПОЛ проводили, соотнося величины соответствующих оптических плотностей и величину оптической плотности, характеризующую изолированные двойные связи. Все измерения производились с использованием спектрофотометра СФ-56 («ЛОМО-Спектр», Санкт-Петербург, Россия). Результаты выражали в единицах индексов окисления (е. и. о.):  $E_{232}/E_{220}$  (относительное содержание диеновых конъюгатов – ДК),  $E_{278}/E_{220}$  (уровень кетодиенов и сопряженных триенов – КДиСТ) и  $E_{400}/E_{220}$  (уровень оснований Шиффа – ШО).

**Определение содержания продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) в слизистом отделяемом голосовых складок** проводили по их реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с последующей спектрофотометрической регистрацией продуктов взаимодействия – динитрофенилгидразонов (ДНФГ) [7, 35]. Для определения использовали 0,1 мл гомогенизированной слизи голосовых складок. После обработки 20 % трихлоруксусной кислотой в первую порцию (опыт) добавляли 0,1 мл 0,1 М раствора 2,4-ДНФГ, а во вторую порцию (контроль) – 0,1 мл 2 М раствора HCl. Далее пробы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и для получения белкового осадка центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10

минут. Осадок промывали 2 раза в 5 мл смеси этанол – этилацетат для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами модифицированных белков. Полученный очищенный осадок высушивали для удаления растворителей и растворяли в 2,5 мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения белкового осадка в каждую пробу предварительно добавляли 15 мкл 2 М раствора HCl.

В изучаемых образцах перед этапом осаждения белка трихлоруксусной кислотой предварительно производили *in vitro* индукцию окисления белков компонентами реакционной смеси, содержащей приготовленные *ex tempore* растворы FeSO<sub>4</sub> (10 мМ), перекиси водорода (0,3 мМ) и ЭДТА (10 мМ). При этом взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода способствует последующему образованию радикала OH· по реакции Фентона:  $Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$ . Производили анализ площади под кривой спектра поглощения ДНФГ-derivатов карбонильных производных белков. Карбонильные производные окисленных белков регистрировали на спектрофотометре в ультрафиолетовой части спектра на длинах волн 230; 254; 270; 280; 356 нм (альдегиддинитрофенилгидразоны – АДНФГ); 363; 370 нм (кетондинитрофенилгидразоны – КДНФГ), а в области видимого света – 428; 430 нм (АДНФГ) и 434; 524; 530; 535 нм (КДНФГ). Перечисленные длины волн были выбраны в соответствии с диапазонами, в которых регистрируются динитрофенилгидразоны. Использованный методический подход позволяет оценить следующие параметры:

- общее количество карбонильных производных белков ( $S_{Omb}$ ), используя спектр окислительной модификации протеинов;
- количество АДНФГ ( $S_{Aднфг}$ ) и КДНФГ ( $S_{кднфг}$ ), регистрируемых как в области ультрафиолетового света (uv), так и видимого (vs) спектра;
- количество производных нейтрального характера ( $S_{Aднфг\ uv}$ ) ( $S_{кднфг\ uv}$ ), характеризующих степень повреждения аминокислотных остатков нейтрального основного характера ( $S_{Aднфг\ vs}$ ) ( $S_{кднфг\ vs}$ );

- подсчитать долю суммарного количества АДНФГ и КДНФГ относительно общего содержания карбонильных производных белков с целью анализа ( $S_{\text{АДНФГ}}$ , % АДНФГ,  $S_{\text{КДНФГ}}$ , % КДНФГ);
- оценить резервно-адаптационный потенциал (РАП), используя значения площадей под кривой спонтанной и индуцированной по реакции Фентона окислительной модификации белков.

Определение количества АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера и сопоставление первичных и вторичных маркеров ОМБ позволило выявить путь нарушения нативной конформации белков. Все измерения производились с использованием спектрофотометра СФ-56 («ЛОМО-Спектр», Санкт-Петербург, Россия).

Оценка уровня ОМБ осуществлялась путем подсчета площади под кривой спектра поглощения ДНФГ-derivатов карбонильных производных белков. Полученное значение выражали в единицах оптической плотности на мг белка (у. е./мг). Производили подсчет отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному по реакции Фентона, принимая результаты измерения индуцированного за 100 %, получая таким образом значение резервно-адаптационного потенциала изучаемой ткани, интегрально характеризующего активность антиоксидантных систем изучаемой ткани.

**Содержание белка** определяли биуретовым методом с использованием набора реагентов ОБЩИЙ БЕЛОК-ОЛЬВЕКС (Санкт-Петербург, Россия). Измерения проводились на спектрофотометре СФ-56 («ЛОМО-Спектр», Санкт-Петербург, Россия) при длине волны 540 нм. Интенсивность окраски реакционной среды измерялась фотометрически при длине волны 540 нм и была пропорциональна концентрации общего белка в пробе (мг/л).

#### **2.2.4 – Морфологические и иммуногистохимические методы исследования**

Забор материала для проведения гистологических и морфометрических исследований производили интраоперационно, маркировали и фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, обезвоживали, обезжировали и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили гистологические срезы толщиной 5–7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Микроскопические исследования проводили на микроскопе DMRXA (Leika, Германия). Анализ препаратов производили с помощью компьютерной программы ImageScoreM (Германия), совмещенной с микроскопом, при увеличении  $\times 100$  и  $\times 400$ . Оценивали клеточный состав субэпителиального слоя: количество фибробластов, нейтрофилов, гистиоцитов, лимфоцитов, площадь сосудистого русла и жидкостного компонента соединительной ткани. Морфометрические показатели подсчитывали в расчете на  $\text{мм}^2$ .

Иммуногистохимическим методом проводилась оценка экспрессии моноклональных антител к Т-лимфоцитам (CD3, CD4, CD8), В-лимфоцитам (CD20), гистиоцитам (CD68), а также регулятору клеточного обновления (bcl-2) и проапоптогенному фактору (p53) в тканях новообразований голосовых складок. Исследования проводили с использованием набора специфических 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 Вр53-11) – и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (Super Frost Plus, Германия). Полученные срезы высушивали в течение 12 часов при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Иммуногистохимический анализ проводился в автоматическом режиме на иммуногистостейнере Bench MarkXT (Ventana, США) с соблюдением протокола исследования. Для визуализации применяли универсальную систему Ultra View Universal DAB (Ventana, США) – комплекс с вторичными антителами и хромоген DAB. Докрашивание проводили Hematoxylin 2

(Ventana, США). После проведения реакции срезы подвергали дегидратации и помещали под покровное стекло. При увеличении микроскопа  $\times 400$  производили подсчет окрашенных клеток с мембранной экспрессией CD3, CD4, CD8, CD20, цитоплазматической экспрессией CD68, bcl-2 и ядерной экспрессией p53 от светло- до темно-коричневого окрашивания на  $1 \text{ мм}^2$  среза ткани.  $1 \text{ мм}^2$  соответствовал трем случайно отобранными полям зрения микроскопа с увеличением объектива  $\times 400$  при диаметре поля зрения  $0,65 \text{ мм}$  (измерено калибровочной линейкой для микроскопа «объект-микрометр») и площади 1 поля зрения, равной  $0,3318 \text{ мм}^2$  (по формуле определения площади круга через диаметр).

### **2.2.5 – Определение цитокинов**

Определение цитокинов в слизистом отделяемом и супернатантах гомогенизированных тканей полипнозно измененных голосовых складок проводили при помощи мультиплексного анализа на иммуноанализаторе Luminex Magpix 100 (США) с использованием тест-системы мультиплексного анализа Bio-Plex (MERZ, Германия) для определения Fractalkine, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 (p70), IL-6, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-21, IL-23, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, I-TAC, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . Особенностью мультиплексного анализа является то, что в основе лежит иммуноанализ типа «сэндвич», в котором антитела связаны с поверхностью микрочастиц, – принцип сходен с общеизвестным иммуноферментным (ELISA) анализом, только используются одновременно частицы разных диаметров (например,  $4,4$  и  $5,5 \text{ мкм}$ ) и антитела, меченные различными флуорохромами.

С целью стандартизации в гомогенате определяли количество белка с перерасчетом содержания цитокинов на  $\text{пг/мг}$  белка.

### **2.2.6 – Методы статистической обработки результатов**

Результаты исследования обрабатывали с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19. Характеристика выборок представлена в формате  $Me (Q_{25}; Q_{75})$ , где  $Me$  – медиана,  $Q_{25}$ ,  $Q_{75}$  – значение нижнего и верхнего квартилей соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Манна – Уитни, Краскела – Уоллиса); для сравнения двух и более относительных показателей, характеризующих частоту определенного признака, применяли точный критерий Фишера [6]. С целью выявления взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена ( $R$ ). Отличия считали статистически значимыми, с учетом поправки Бонферрони, при уровне  $p \leq 0,02$ .



## ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 – Характеристика изменений тканевого гомеостаза при разных формах экссудативных поражений пространства Рейнке

#### 3.1.1 – Клинико-морфологическая характеристика различных форм экссудативных поражений пространства Рейнке

Все разновидности ЭППР имели свои клинические и морфологические особенности и схожую гистологическую структуру, обусловленную особым строением пространства Рейнке.

Полипы голосовых складок располагались асимметрично на желудочковой части голосовых складок в виде мягкоэластичных или более плотных образований от бледно-розового до ярко-красного цвета в зависимости от плотности расположения сосудистой сети, наличия кровоизлияний и площади жидкостного компонента стромы. Размеры полипов в среднем  $3,2 \pm 0,5$  мм, на плотном основании, но, по данным литературы [9, 59, 219], они могут достигать размеров 1,5–2 см, иметь широкое основание или тонкую ножку и свободно смещаться при акте дыхания (*рисунок 3*).



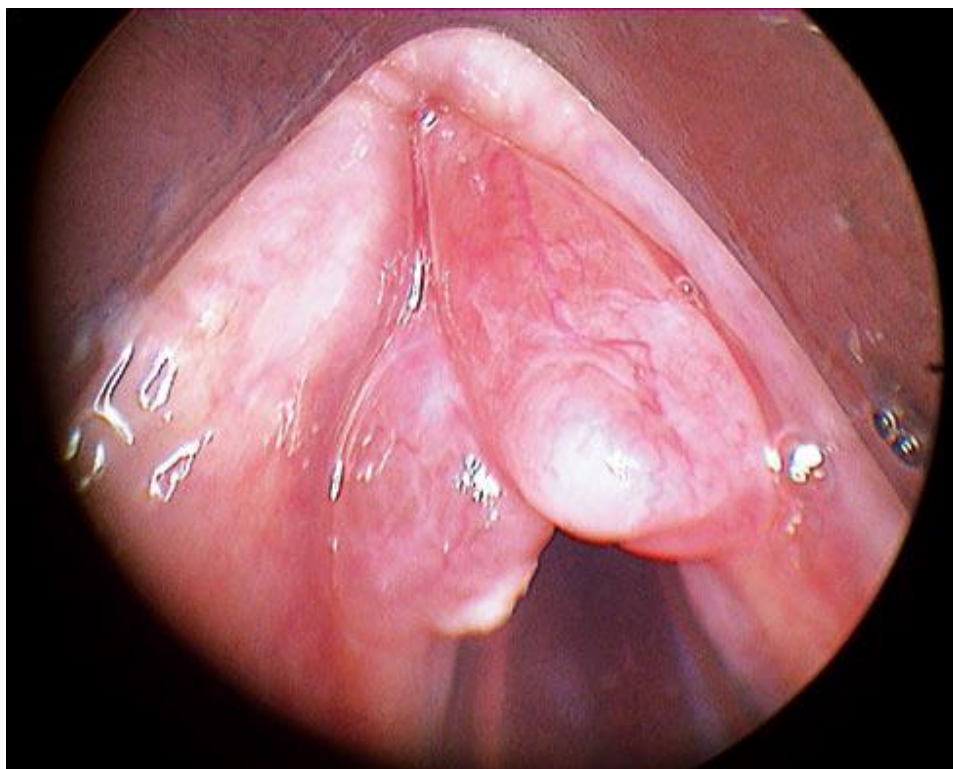
**Рисунок 3 – Полип миксоидный правой голосовой складки**  
*Примечание: Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ .*

Ларингоскопическая картина узелков голосовых складок характеризовалась наличием, как правило, симметричных плотных веретенообразной формы образований, расположенных на медиальной поверхности голосовых складок, бледно-розового или красного цвета, с наличием участков кровоизлияний, размерами 2–4 мм (*рисунок 4*).



**Рисунок 4 – Узелки голосовых складок. Слева сформированный узелок (ранняя стадия); справа, симметрично, начало формирования узелка**  
*Примечание: Эндоларингоскопия, ув. ×2.*

Отек Рейнке, или полиповидная дегенерация голосовых складок, при фиброларингоскопии выглядел как симметричный отек, занимающий практически весь длинник складки, с полиповидными образованиями, исходящими из мембранозной части голосовых складок, с хорошо выраженным сосудистым рисунком (*рисунок 5*).



**Рисунок 5 – Отек Рейнке голосовых складок, двусторонний**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ .

При оценке морфологии ЭППР голосовых складок обнаружены следующие изменения. В целом во всех исследованных препаратах голосовых складок присутствовали фрагменты рыхлой неоформленной соединительной ткани с покровными пластами многослойного плоского эпителия, граница между эпителиальной и рыхлой соединительной тканью представлена тонкой базальной мембраной. Из резидентных клеток в соединительнотканной строме преобладали в основном зрелые веретеновидные или звездчатые фибробласты и гистиоциты. Тонкостенные сосуды микроциркуляторного русла немногочисленные, равномерно распределенные в рыхлой соединительной ткани. Волокнистый матрикс выполнен чаще всего тонкими извитыми соединительнотканскими волокнами, ориентированными преимущественно параллельно поверхности органа.

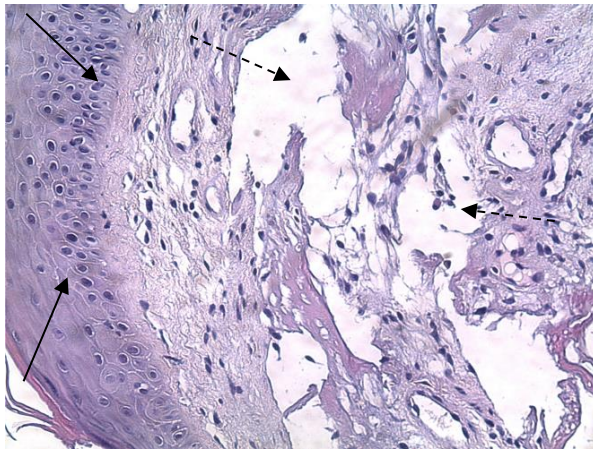
На ранних стадиях формирования ЭППР для всех форм характерными особенностями являлись наличие стромального отека, расширение и истончение сосудов микрокапиллярного типа с расстройством

кровообращения в виде явлений стаза, тромбоза, плазморрагий, явлениями пролиферации фибробластов. На более поздних стадиях наблюдалась выраженная клеточная инфильтрация, гиалиноз стромы, отложения гемосидерина, фибронектина, утолщение суббазальной мембраны и собственной пластинки.

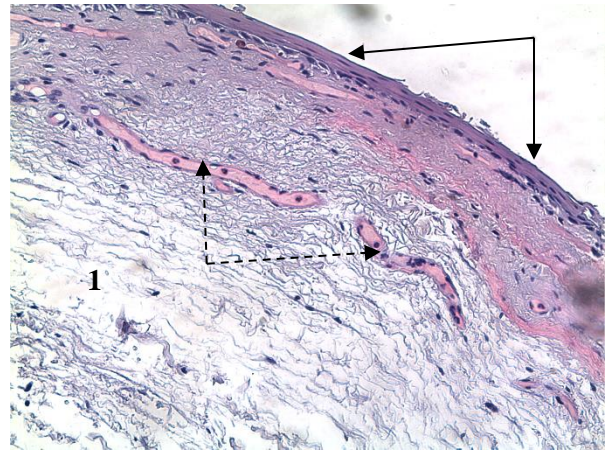
По результатам гистологического исследования полипов голосовых складок нами выделены два основных морфологических типа: миксоидный, или отечный, тип (18 образцов) и ангиоматозный (22 образца) – в зависимости от преобладания жидкостного или сосудистого компонента стромы.

Миксоидный, или отечный, тип полипов (*рисунки 6, 7*) характеризовался утолщением эпителиального пласта с картиной умеренного акантоза и формированием интраэпителиальных мелких кистозных полостей, частично заполненных жидкостью и массами гемолизированных эритроцитов. Базальная мембрана практически во всех образцах отчетливо выражена. В соединительнотканной строме под эпителиальным пластом отмечалось умеренное кровенаполнение сосудов всех калибров, фиксировались участки отечной стромы, островки лимфогистиоцитарной инфильтрации, с примесью небольшого количества эозинофильных лейкоцитов, чередующихся с очагами пролиферации фибробластов. Соединительнотканнные волокна стромы разрыхлены, раздвинуты отечной жидкостью с образованием мелких полостей неправильной формы, иногда заполненных гомогенными или мелкозернистыми массами розоватого окрашивания (*рисунки 6Б–6Г*). В цитоплазме эпителиоцитов содержалось большое количество зерен гликогена.

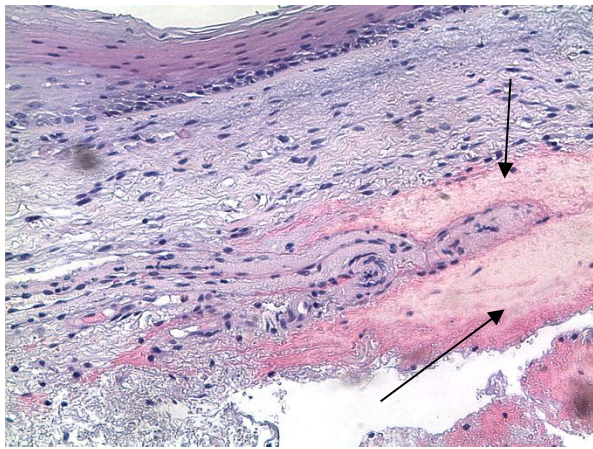




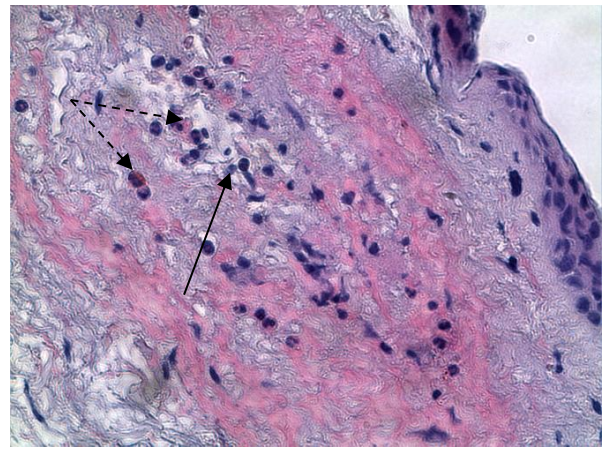
А



Б



В



Г

**Рисунок 6 – Морфологические изменения при миксоидном, или отечном, типе полипов голосовых складок**

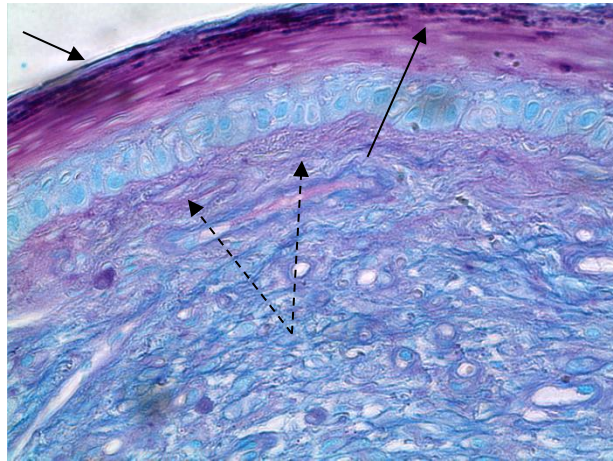
*Примечание:* окраска гематоксилином и эозином:  
 А – неравномерность расположения ядер клеток в пласте многослойного плоского эпителия (сплошные стрелки), резкий отек рыхлой соединительной ткани с формированием мелких полостей неправильной формы (пунктирные стрелки) (ув.  $\times 200$ );

Б – атрофия и истончение эпителиального пласта (сплошные стрелки), венозное и капиллярное полнокровие с картиной эритро- и лейкостазов (пунктирные стрелки) в резко отечной соединительнотканной строме (1) (ув.  $\times 200$ );

В – соединительнотканнные волокна стромы разрыхлены, раздвинуты отечной жидкостью и гомогенными мелкозернистыми массами розоватого окрашивания (сплошные стрелки) (ув.  $\times 200$ );

Г – очаговый нейтрофильно-лимфоцитарный инфильтрат (сплошная стрелка) с примесью эозинофильных лейкоцитов (пунктирные стрелки) в отечной соединительнотканной строме (ув.  $\times 400$ ).

В цитоплазме эпителиоцитов верхних слоев содержались зерна гликогена, в то время как в цитоплазме клеток базального слоя и 1–2-го рядов клеток нижних слоев гликоген при PAS-реакции не определялся. Базальная мембрана видна неотчетливо, «размыта», в некоторых препаратах фрагментирована, в других случаях волокна ее раздвинуты отечной жидкостью (рисунок 7).



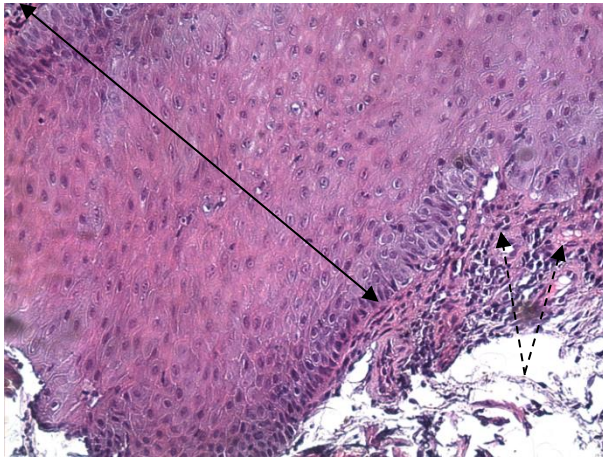
**Рисунок 7 – Гистологическая картина в биоптатах голосовых складок при миксоидном, или отечном, типе полипов**

*Примечание:* PAS-реакция, ув.  $\times 400$ ; зерна гликогена содержатся в цитоплазме верхних слоев многослойного плоского эпителия (сплошные стрелки); слабо окрашенная основным фуксином отечная базальная мембрана (пунктирные стрелки).

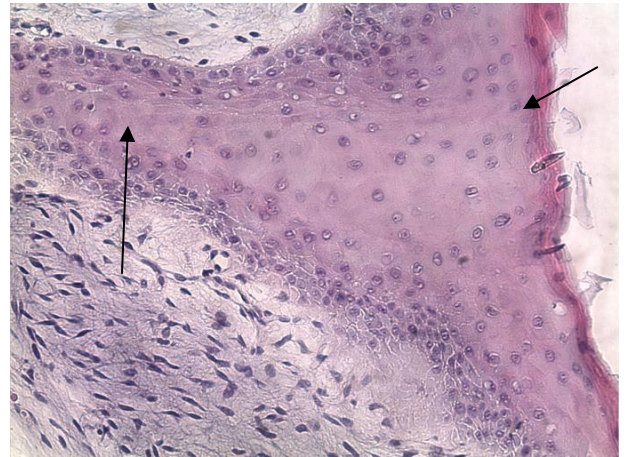
При ангиоматозном типе полипов (рисунки 8, 9) отмечалось утолщение пласта покровного многослойного плоского эпителия с явлениями акантоза и ороговения. Базальная мембрана хорошо выражена во всех образцах. Цитоплазма эпителиоцитов богата зернами гликогена. В рыхлой соединительной ткани фиксировалось увеличение количества сосудов микроциркуляторного русла на единице площади в сравнении с образцами других ЭППР. Субэпителиально выявлялись преимущественно мелкого и среднего калибра полнокровные сосуды, в стромальном компартменте располагались сосуды с повышенным количеством толстых малоизвитых соединительнотканых волокон. В строме отмечались участки расстройств кровообращения: стаз, тромбоз, диапедезные кровоизлияния. В клеточном



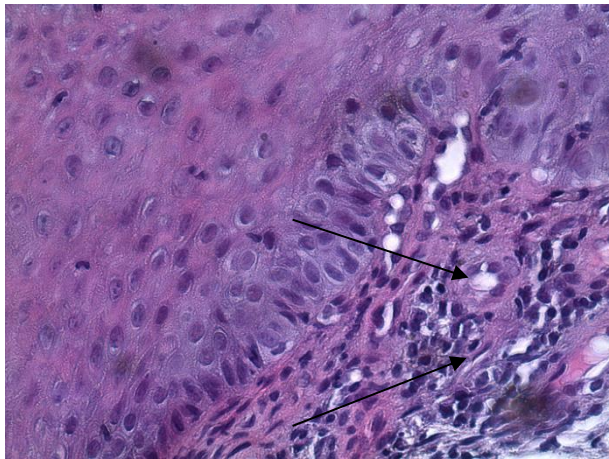
составе преобладали фибробласты, реже встречались гистиоциты, лимфоциты, плазмоциты и единичные нейтрофилы.



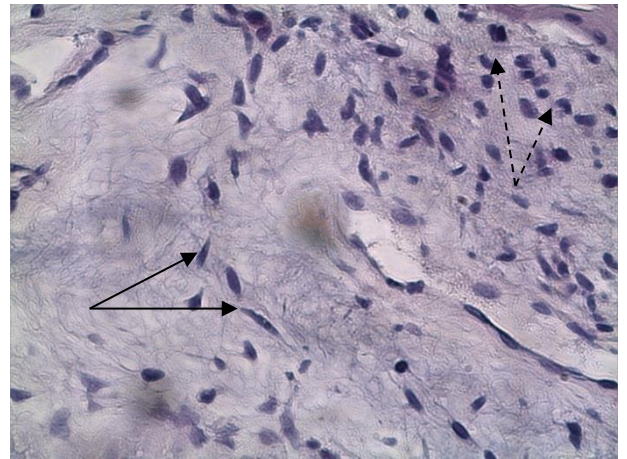
А



Б



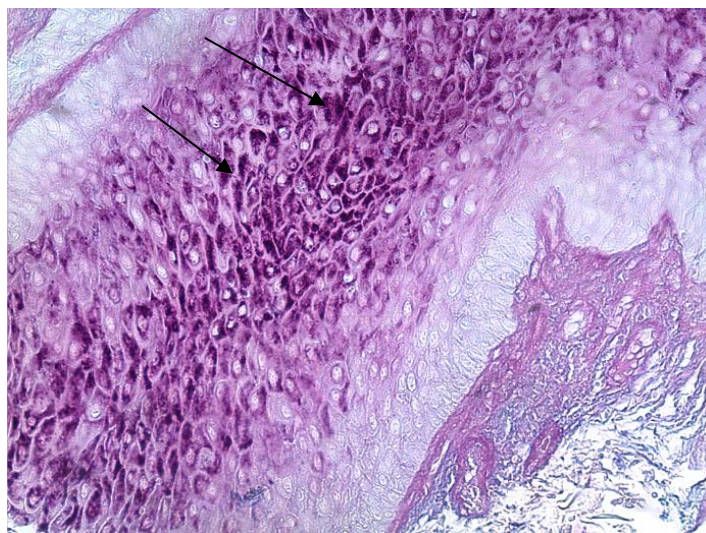
В



Г

**Рисунок 8 – Гистологическая картина в биоптатах полипов голосовых складок при ангиоматозном типе**

*Примечание:* окраска гематоксилином и эозином: А – утолщенный пласт многослойного плоского эпителия (сплошная стрелка), в субэпителиальной зоне – большое количество сосудов мелкого калибра (пунктирные стрелки), ув.  $\times 200$ ; Б – роговые массы (сплошные стрелки) на поверхности многослойного плоского эпителия, ув.  $\times 400$ ; В – многочисленные сосуды мелкого калибра (сплошные стрелки) в субэпителиальной зоне, ув.  $\times 400$ ; Г – участок огрубения стромы с пролиферирующими фибробластами (сплошные стрелки) и небольшой лимфогистиоцитарный инфильтрат (пунктирные стрелки), ув.  $\times 200$ .

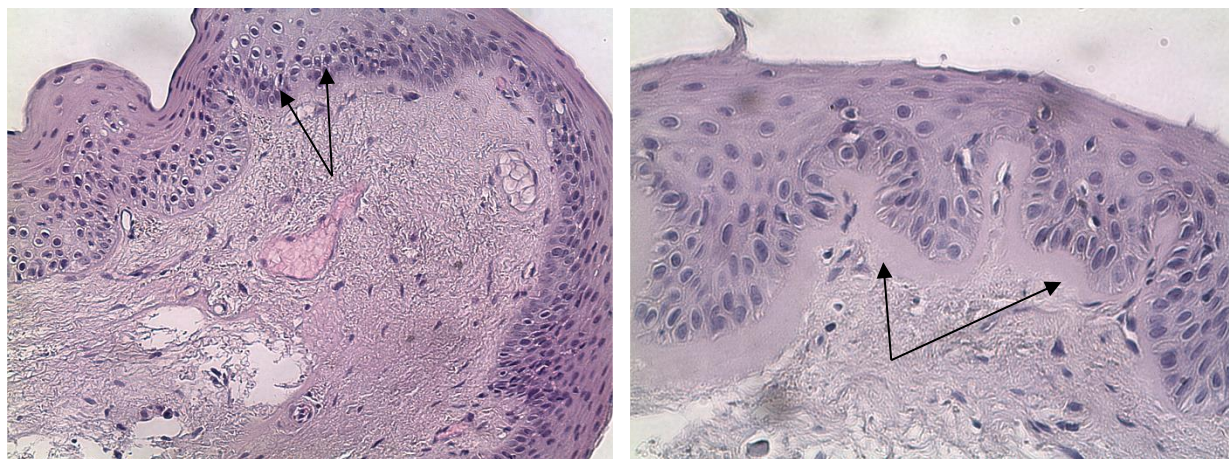


**Рисунок 9 – Гистологическая картина в биоптатах полипов голосовых складок при ангиоматозном типе**

*Примечание:* PAS-реакция, ув.  $\times 200$ : большое количество зерен гликогена (сплошные стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов.

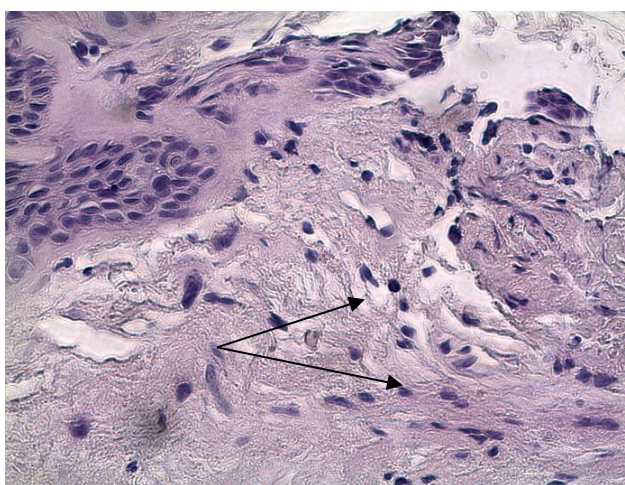
При гистологическом исследовании голосовых узелков (*рисунки 10, 11*) отмечено наличие пластов покровного многослойного плоского эпителия различной толщины, с хорошо выраженной стратификацией, умеренным акантозом и участками гиперкератоза. Базальная мембрана во всех полях зрения утолщена. В цитоплазме эпителиальных клеток содержалось умеренное количество зерен гликогена. В подлежащей рыхлой соединительной ткани наблюдалось умеренное полнокровие сосудов всех калибров, небольшой отек межучной ткани. Соединительнотканые волокна внеклеточного матрикса набухшие, слабо извитые, уложены в компактные пучки, ориентированные преимущественно параллельно поверхности органа. В клеточном составе выявлялись в основном зрелые фибробласты и небольшое количество макрофагов и лимфоцитов.





А

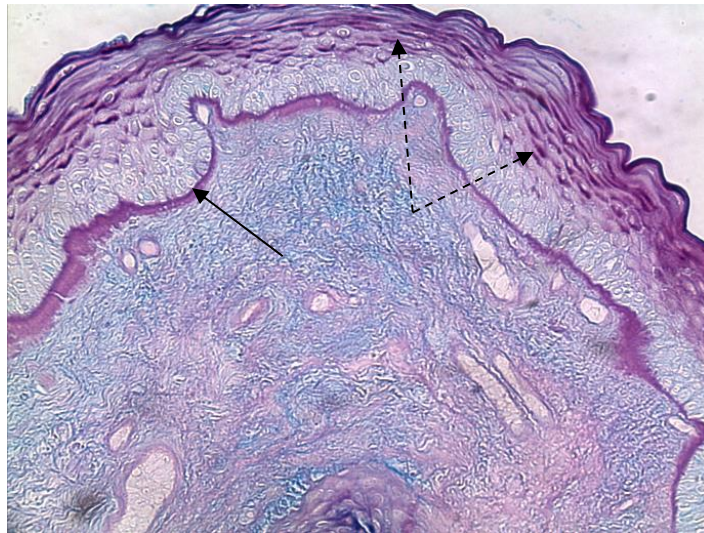
Б



В

### Рисунок 10 – Гистологическая картина в биоптатах голосовых узелков

*Примечание:* окраска гематоксилином и эозином: А – явления умеренного акантоза многослойного плоского эпителия (сплошные стрелки), ув.  $\times 200$ ; Б – утолщенная базальная мембрана (сплошные стрелки), ув.  $\times 400$ ; В – в рыхлой соединительной ткани на фоне огрубения внеклеточного матрикса разреженный продуктивный воспалительный инфильтрат (сплошные стрелки), ув.  $\times 400$ .

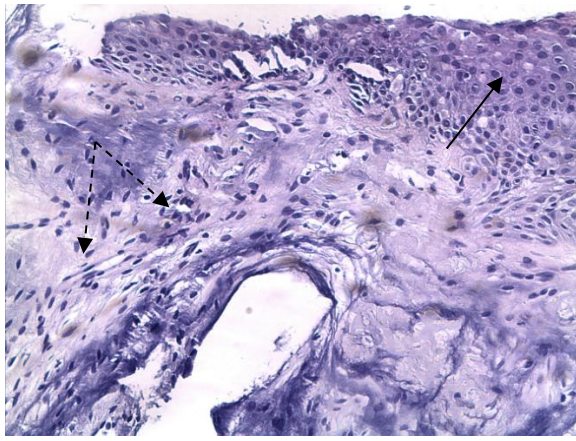


**Рисунок 11 – Гистологическая картина в биоптатах голосовых узелков**

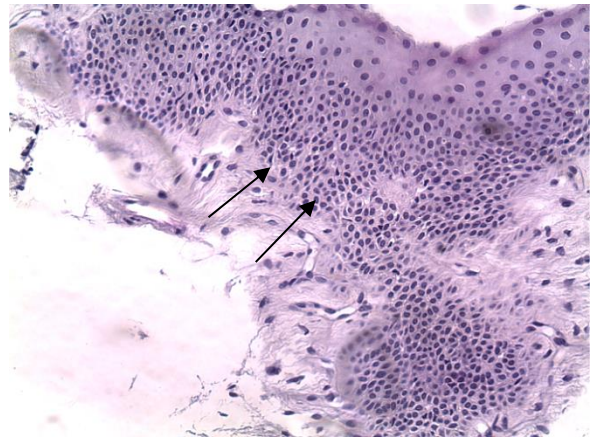
*Примечание:* PAS-реакция, ув.  $\times 200$ : выраженная фуксинофилия базальной мембраны (сплошная стрелка), умеренное количество зерен гликогена в цитоплазме эпителиальных клеток (пунктирные стрелки).

Морфологически при отеке Рейнке определялась четкая граница между эпителиальной и рыхлой соединительной тканью в виде хорошо выраженной базальной мембраны (рисунок 12). В биоптатах этой группы наблюдалось утолщение эпителиального пласта с картиной умеренного акантоза и формированием интраэпителиальных мелких кистозных полостей, заполненных массами гемолизированных эритроцитов. В соединительнотканной строме преобладали макрофаги и плазматические клетки, реже встречались фибробласты и нейтрофилы. Сосуды микроциркуляторного русла немногочисленны и распределены равномерно в рыхлой соединительной ткани. Под эпителиальным пластом наблюдалось умеренное кровенаполнение сосудов всех калибров с участками отека стромы, чередующимися с очагами пролиферации фибробластов и огрубения стромы. Во всех полях зрения в субэпителиальной зоне видны рыхлые инфильтраты, состоящие из нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов с примесью умеренного количества макрофагов и плазматических клеток. Эпителий нередко уплощен.

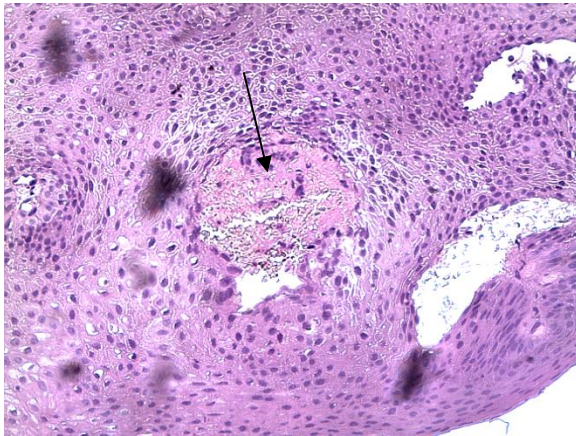




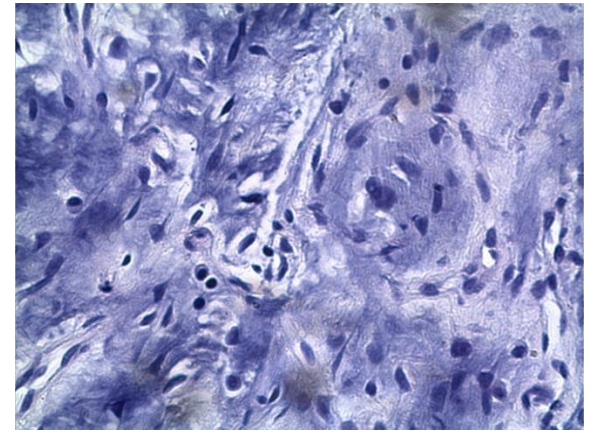
А



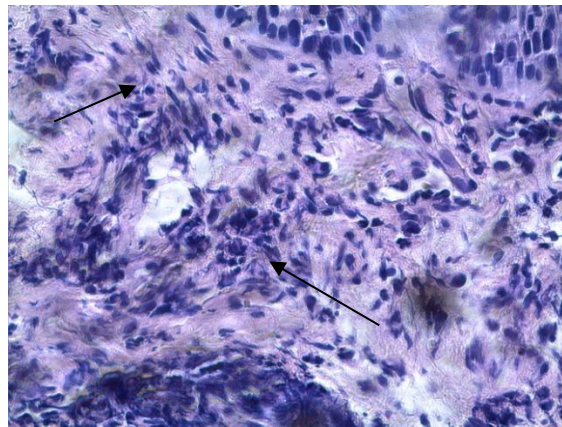
Б



В



Г

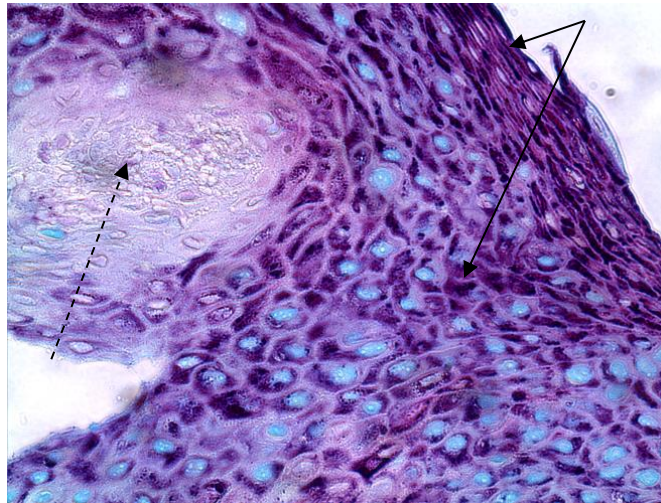


Д

**Рисунок 12 – Гистологическая картина в биоптатах голосовых складок при отеке Рейнке**

*Примечание:* окраска гематоксилином и эозином: А – утолщение покровного пласта многослойного плоского эпителия (сплошная стрелка), умеренный отек и разрыхление соединительнотканной стромы с рыхлой хронической воспалительной инфильтрацией (пунктирные стрелки), ув.  $\times 200$ ; Б – умеренный акантоз (сплошные стрелки) покровного эпителиального пласта, ув.  $\times 200$ ; В – мелкая интраэпителиальная киста (сплошная стрелка), полость которой заполнена компактными массами гемолизированных эритроцитов, ув.  $\times 400$ ; Г – рыхлый хронический воспалительный инфильтрат в соединительной ткани голосовой складки, ув.  $\times 400$ ; Д – участок пролиферации фибробластов (сплошные стрелки) с явлениями фибриллогенеза и огрубения стромы, ув.  $\times 400$ .

В цитоплазме эпителиоцитов верхних слоев содержались многочисленные зерна гликогена (*рисунок 13*), отмечался резкий отек рыхлой соединительной ткани с формированием мелких полостей неправильной формы. Полости заполнены прозрачным желатинозным содержимым невоспалительного характера.



**Рисунок 13 – Гистологическая картина в биоптатах голосовых складок при отеке Рейнке**

*Примечание:* PAS-реакция: цитоплазма эпителиоцитов заполнена зернами гликогена (сплошные стрелки); интраэпителиальная киста (пунктирная стрелка)

Изучение морфометрических параметров в тканях ЭППР позволило установить ряд особенностей клеточного состава новообразований (*таблица 4*).

**Таблица 4 – Морфометрические показатели в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
Субэпителиальная зона				
Нейтрофилы, ед/мм <sup>2</sup>	12,1 (9,4; 14,2)	7,6 (6,2; 10,8)	11,2 (8,4; 13,4)	8,4 (6,3; 10,9)
	–			
Лимфоциты, ед/мм <sup>2</sup>	28,4 (24,1; 30,7)	57,6 (54,2; 60,3)	37,6 (32,4; 39,8)	62,4 (58,2; 65,4)
	0,002 <sub>1-2</sub> 0,003 <sub>1-4</sub> 0,01 <sub>2-3</sub>			
	–			
Гистиоциты, ед/мм <sup>2</sup>	25,2 (16,3; 28,9)	46,3 (35,4; 54,8)	27,8 (24,8; 32,7)	54,8 (48,6; 63,7)
	0,04 <sub>1-2</sub> 0,03 <sub>1-4</sub> 0,002 <sub>2-3</sub>			
	–			
Макрофаги, ед/мм <sup>2</sup>	22,7 (16,3; 27,3)	11,4 (10,6; 18,4)	18,2 (16,4; 21,3)	19,1 (15,7; 26,6)
	–			
Фибробласты, ед/мм <sup>2</sup>	64,8 (58,1; 70,1)	23,7 (21,2; 36,2)	53,4 (47,4; 56,9)	27,8 (25,2; 39,7)
	0,003 <sub>1-2</sub> 0,02 <sub>2-3</sub> 0,01 <sub>3-4</sub> 0,004 <sub>1-4</sub>			
	–			
	–			
Высота эпителиального пласта, мкм	114,6 (103,3; 121,4)	247,8 (232,1; 251,4)	89,1 (78,1; 96,4)	198,9 (182,3; 204,6)
	0,02 <sub>1-2</sub> 0,001 <sub>2-3</sub> 0,002 <sub>3-4</sub> 0,04 <sub>1-4</sub>			
	–			
	–			
Соединительная ткань				
Удельная площадь сосудистой сети, у. е.	0,34 (0,32; 0,37)	0,09 (0,04; 0,11)	0,27 (0,25; 0,30)	0,10 (0,08; 0,12)
	0,001 <sub>1-2</sub> 0,01 <sub>2-3</sub> 0,02 <sub>3-4</sub> 0,004 <sub>1-4</sub>			
	–			
	–			
Удельная площадь жидкостного компонента ткани, у. е.	0,07 (0,05; 0,09)	0,32 (0,26; 0,38)	0,10 (0,08; 0,12)	0,29 (0,25; 0,32)
	0,03 <sub>1-2</sub> 0,001 <sub>2-3</sub> 0,001 <sub>3-4</sub> 0,03 <sub>1-4</sub>			
	–			
	–			

Клеточный состав тканей изучали преимущественно в субэпителиальной зоне, включающей элементы мукозоассоциированной ткани региона гортани. Установлено, что количество нейтрофилов в тканях всех изучаемых ЭППР оказалось самым малочисленным и не имело значимых различий между группами. Вероятно, это связано с отсутствием классических острых воспалительных изменений в тканях, что подтверждается и данными эндоларингоскопии.

Согласно данным литературы, в составе МАЛТ гортани конститутивно присутствуют преимущественно клеточные элементы моноцитарно-макрофагального ряда, что связано с обеспечением иммунного гомеостаза данной зоны [69, 205].

В тканях «плотных» новообразований, к которым по результатам морфологического исследования мы отнесли ангиоматозный тип полипов и узелки голосовых складок, было отмечено повышение количества фибробластов в сравнении с тканями «мягких» новообразований, к которым относятся миксоидный тип полипов и отек Рейнке. Фибробласты – основные клеточные элементы стромы органа, одной из функций которых является поддержание тканевого гомеостаза. В условиях хронического перенапряжения голосовых складок или воздействия токсичных ирритантов (табачного дыма, компонентов желчи) фибробласты, наряду с макрофагами, способны менять собственный фенотип на воспалительный и секретировать воспалительные белки, хемокины и факторы роста. Кроме того, фибробласты принимают активное участие в процессах репарации, восстанавливая структуру внеклеточного матрикса, и ремоделирования ткани в зонах продолжительных ишемически-гипоксических изменений, например, при сдавлении отечной жидкостью [34, 180].

Напротив, в тканях «мягких» новообразований зафиксировано наибольшее представительство лимфоцитов и гистиоцитов, что значительно различается с группами «плотных» ЭППР. Гистиоциты, располагаясь преимущественно в соединительнотканной зоне, поддерживают (наряду



с фибробластами) тканевой гомеостаз посредством возможности трансформации в типичные макрофаги при определенных условиях, например, при хронической механической травме, микробной инвазии. За счет высокой активности лизосомальных ферментов гистиоциты проявляют цитолитические свойства в отношении патогенов. В этих же группах нами зафиксирована максимальная высота эпителиального пласта. Кроме того, известно, что в слизистой оболочке гортани имеет место обилие и других иммунологически активных клеток, в частности, идентифицированы популяции Т-лимфоцитов ( $CD4^{+}$ -,  $CD8^{+}$ -клетки) с экспрессией антигенов системы HLA класса II, макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты и НК-клетки, а также гранулоциты и эозинофилы [69, 205].

Иммуногистохимические исследования, проведенные на биоптатах, показывают, что слизистая оболочка голосовых складок у пациентов при всех формах ранних проявлений ЭППР имеет повышенную субэпителиальную васкуляризацию с большим количеством расширенных с истонченными стенками капилляров. Отмечается повышенная ломкость капилляров и изменение сосудистого рисунка в пространстве Рейнке. Повышенная проницаемость является причиной отека тканей этой области, что способствует прогрессированию заболевания и появлению кровоизлияний в голосовые складки при повышении голосовых нагрузок. Исследование нами удельной площади сосудистой сети в соединительной ткани ЭППР показало ее превалирование в «плотных» новообразованиях. Напротив, в соединительной ткани «мягких» полипов и при отеке Рейнке обнаружено преобладание отечного компонента, основу которого составляет серозный транссудат, вследствие повышения проницаемости сосудистой стенки и затруднения оттока лимфы, что соотносится с исследованиями ряда авторов [8, 14, 217]. Компоненты соединительнотканной стромы образуют тонкопетлистую сеть, пространства которой заполнены отечной жидкостью.

Таким образом, исследование биоптатов ЭППР показало ряд схожих морфологических особенностей, характерных для отека Рейнке и полипов

миксоидного типа, заключающихся в наличии выраженного отека рыхлой соединительной ткани, обилии мелких кистозных полостей, заполненных желатинозной невоспалительного характера жидкостью, наличии очагов лимфогистиоцитарной инфильтрации, большого количества зерен гликогена в эпителиоцитах, свидетельствующих о дистрофических изменениях в пораженных тканях. Отмечалось превалирование лимфоцитов, гистиоцитов, сравнительное увеличение высоты эпителиального пласта и жидкостного компонента соединительной ткани.

Были выявлены характерные морфологические изменения, объединяющие ткани голосовых узелков и полипов ангиоматозного типа, заключающиеся в высокой плотности сосудистого компонента тканей, выраженном полнокровии сосудов с расстройствами кровообращения, утолщении многослойного плоского эпителия, с явлениями акантоза, количественным преобладанием фибробластов над другими клетками и высокой удельной площадью сосудистой сети.

### **3.1.2 – Характер изменений цитокинового профиля, параметров адаптивного иммунитета, маркеров клеточного обновления и ремоделинга в зоне мукозоассоциированной лимфоидной ткани региона гортани при различных формах экссудативных поражений пространства Рейнке**

Мукозоассоциированная лимфоидная ткань региона гортани при формировании ЭППР имеет повышенную васкуляризацию, с большим количеством расширенных с истонченными стенками капилляров, отличающихся высокой ломкостью. Иммунные клетки МАЛТ гортани принимают активное участие в реакциях иммунного реагирования при формировании различной патологии голосовых складок.

Имуногистохимическое типирование лимфоидных клеток в образцах морфологически неоднородных опухолеподобных образований голосовых складок показало ряд значимых различий в содержании отдельных популяций Т- и В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов (*таблица 5*). Ткани



голосовых складок при отеке Рейнке содержали наибольшее количество лимфоидных клеток ( $CD3^+$ -лимфоцитов,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD20^+$ ), расположенных преимущественно субэпителиально, при этом численность клеток моноцитарно-макрофагального ряда ( $CD68^+$ ) при данной патологии гортани оказалась минимальной. При ангиоматозном, миксоидном типах полипов и голосовых узелках число популяций Т- и В-лимфоцитов и основных субпопуляций Т-лимфоцитов в тканях не имело значимых различий, что, вероятно, обусловлено принадлежностью к одной клинико-морфологической группе и общностью патогенеза.

**Таблица 5 – Содержание отдельных субпопуляций иммунных клеток и клеток с экспрессией ММР-9 в тканях опухолеподобных образований голосовых складок, в ед/мм<sup>2</sup> [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
$CD3^+$ -лимфоциты	38,3 (34,6; 40,1) *	34,6 (29,6; 37,8) *	28,6 (24,6; 32,6) *	204,4 (187,3; 211,3)
$CD4^+$ -лимфоциты	28,6 (22,5; 30,4) *	30,2 (26,8; 33,2) *	24,3 (22,5; 28,8) *	117,2 (103,6; 122,4)
$CD8^+$ -лимфоциты	15,6 (13,2; 16,1) *	14,7 (12,3; 16,5) *	12,2 (10,5; 14,6) *	89,4 (84,6; 99,7)
$CD20^+$ -лимфоциты	8,2 (6,8; 10,4) *	10,6 (9,4; 12,3) *	13,0 (8,8; 15,8) *	24,3 (22,8; 30,5)
$CD68^+$ -лимфоциты	76,5 (72,3; 80,1)	18,6 (12,5; 22,1) #	128,5 (112,3; 136,9)	16,3 (14,8; 21,5) #
ММР-9 <sup>+</sup> -лимфоциты	29,1 (24,8; 33,9)	13,6 (11,8; 16,6) #	58,9 (52,3; 68,8)	17,3 (14,4; 19,5) #

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с (4); # – с (1) и (3).

Следует отметить, что ведущим компонентом патогенеза всех экссудативных поражений голосовых складок являются расстройства микроциркуляции в пространстве Рейнке с развитием капилляро- и лимфостаза и интерстициального отека, а специфичность поражений

обусловлена типичным расположением на голосовых складках: отек Рейнке – на мембранозной части, полипы – на желудочковой части, голосовые узелки – на медиальной поверхности. Примечательно, что ни в одном из представленных образцов ЭППР не обнаружено признаков острого воспалительного процесса, характер экссудата – серозно-слизистый. Клетки моноцитарно-макрофагального ряда, экспрессирующие CD68<sup>+</sup>, при всех разновидностях ЭППР располагались как интраэпителиально, так и субэпителиально, преимущественно очаговыми скоплениями, наибольшее их количество зафиксировано при ангиоматозном типе и в тканях голосовых узелков. Максимальное количество клеток эндотелия, эпителия базальных мембран, фибробластов, экспрессирующих MMP-9, также зафиксировано при ангиоматозном типе полипов и в тканях голосовых узелков, которые по гистологической структуре представляют ангиоматозно-фиброзные образования, что свидетельствует о процессах ремоделирования соединительнотканного матрикса, базальных мембран эпителия и эндотелия микрососудов.

В формировании опухолеподобных ЭППР вносит определенный вклад дисбаланс регуляторов клеточного обновления. Нами была изучена частота встречаемости и цитоплазматическая экспрессия регуляторов апоптоза p53 и bcl-2 в лимфоцитах и клетках базального эпителия в образцах ЭППР. Сравнение частоты встречаемости позитивных по наличию экспрессии регулятора апоптоза p53 лимфоцитов при разных видах ЭППР показало отсутствие значимых различий между данными группами (таблица 6).

**Таблица 6 – Распределение образцов тканей по наличию лимфоцитарной экспрессии p53 при различных ЭППР**

Наличие лимфоцитов с экспрессией p53	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n=7 (3)	Отек Рейнке n=14 (4)
	Ангиоматозный тип n=10 (1)	Миксоидный тип n=9 (2)		
Позитивная экспрессия	6 (60,0 %)	5 (55,6 %)	4 (57,1 %)	9 (64,3 %)
Негативная экспрессия	4 (40,0 %)	4 (44,4 %)	3 (42,9 %)	5 (35,7 %)
Fisher exact, p	–	0,6	0,6	0,5

*Примечание:* данные представлены в абсолютных значениях (в процентах); для сравнения использовали точный критерий Фишера ( $p \leq 0,05$ ).

Значимо большее количество p53-позитивных образцов тканей с экспрессией маркера в клетках базального эпителия отмечено при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке в сравнении с ангиоматозным типом полипов и голосовыми узелками (таблица 7). Известно, что уровень экспрессии и активность белка p53 не ограничиваются проапоптогенными свойствами последнего, а способствуют также изменению настройки клеточного метаболизма, регуляции активности антиоксидантных систем, более экономному расходованию ресурсов энергии [48]. Можно предположить, что значительные нарушения микроциркуляции, более выраженные при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке, приводят к усилению экспрессии проапоптогенных факторов, в том числе и в клетках базального эпителия, испытывающих наибольшую гипоксически-ишемическую нагрузку вследствие давления отечной жидкости.

**Таблица 7 – Распределение образцов тканей по наличию экспрессии p53 в клетках базального эпителия в зависимости от морфологического типа ЭППР**

Наличие клеток базального эпителия с экспрессией p53	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n=7 (3)	Отек Рейнке n=14 (4)
	Ангиоматозный тип n=10 (1)	Миксоидный тип n=9 (2)		
Позитивная экспрессия	4 (40,0 %)	8 (88,9 %)	5 (71,4 %)	12 (85,7 %)
Негативная экспрессия	6 (60,0 %)	1 (11,1 %)	2 (28,6 %)	2 (14,3 %)
Fisher exact, p	–	0,03 <sub>1-2</sub>	0,6	0,02 <sub>1-4</sub>

*Примечание:* данные представлены в абсолютных значениях (в процентах); для сравнения использовали точный критерий Фишера ( $p \leq 0,05$ ).

Исследование частоты встречаемости образцов, позитивных по экспрессии антиапоптогенного белка bcl-2 лимфоцитов, не показало значимых различий между изучаемыми ЭППР (таблица 8).

**Таблица 8 – Распределение образцов тканей по наличию лимфоцитарной экспрессии bcl-2 при различных ЭППР**

Наличие лимфоцитов с экспрессией bcl-2	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n=7 (3)	Отек Рейнке n=14 (4)
	Ангиоматозный тип n=10 (1)	Миксоидный тип n=9 (2)		
Позитивная экспрессия	5 (50,0 %)	6 (66,7 %)	3 (42,9 %)	8 (57,1 %)
Негативная экспрессия	5 (50,0 %)	3 (33,3 %)	4 (57,1 %)	6 (42,9 %)
Fisher exact, p	–	0,4	0,6	0,5

*Примечание:* данные представлены в абсолютных значениях (в процентах); для сравнения использовали точный критерий Фишера ( $p \leq 0,05$ ).

В образцах полипов миксоидного типа и при отеке Рейнке было обнаружено значимо меньше позитивных по экспрессии bcl-2 клеток базального эпителия, что может отражать готовность данных клеток к реализации апоптогенных сигналов (таблица 9).

**Таблица 9 – Распределение образцов тканей по наличию экспрессии bcl-2 в клетках базального эпителия в зависимости от морфологического типа эксудативных поражений пространства Рейнке (ЭППР)**

Наличие клеток базального эпителия с экспрессией bcl-2	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 7 (3)	Отек Рейнке n = 14 (4)
	Ангиоматозный тип n = 10 (1)	Миксоидный тип n = 9 (2)		
Позитивная экспрессия	6 (60,0 %)	1 (11,1 %)	5 (71,4 %)	3 (21,4 %)
Негативная экспрессия	4 (40,0 %)	8 (88,9 %)	2 (28,6 %)	11 (78,6 %)
Fisher exact, p	–	0,02 <sub>1-2</sub>	0,15	0,04 <sub>1-4</sub>

*Примечание:* данные представлены в абсолютных значениях (в процентах); для сравнения использовали точный критерий Фишера ( $p \leq 0,05$ ).

Исследование содержания регуляторов апоптоза на единицу площади ткани ( $\text{мм}^2$ ) в позитивных по наличию экспрессии bcl-2 и p53 образцах различных морфологических типов ЭППР показало снижение содержания bcl-2-позитивных лимфоцитов при миксоидном типе полипов и отеке Рейнке в сравнении с ангиоматозным типом полипов и тканями голосовых узелков (таблица 10). В то же время максимальное количество bcl-2-позитивных клеток базального эпителия зафиксировано в тканях голосовых узелков в сравнении с другими изучаемыми ЭППР. Подсчет количества позитивных по экспрессии p53 лимфоцитов не показал значимых различий между группами. Однако число p53-позитивных клеток базального эпителия при миксоидном типе и (максимально) отеке Рейнке на единицу площади ткани значимо превышало аналогичные показатели при ангиоматозном типе полипов и в тканях голосовых узелков.

**Таблица 10 – Содержание регуляторов апоптоза в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке (ЭППР), в ед/мм<sup>2</sup> [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР							
	Полипы голосовых складок				Узелки голосовых складок		Отек Рейнке	
	Ангиоматозный тип n = 10 (1)		Миксоидный тип n = 9 (2)		n = 7 (3)		n = 14 (4)	
	Лимфоциты	Базальный эпителий	Лимфоциты	Базальный эпителий	Лимфоциты	Базальный эпителий	Лимфоциты	Базальный эпителий
bcl-2- позитивные клетки	68,3 (33,2; 98,0)	4,1 (3,2; 12,5)	10,2 (5,8; 21,2)*	3,2 (2,2; 4,6)	46,3 (38,3; 67,1)	25,9 (19,3; 34,2) <sup>#</sup>	13,1 (12,1; 16,8)*	3,1 (1,5; 3,5)
p53- позитивные клетки	4,2 (3,5; 5,4)	12,5 (2,3; 50,5)	7,2 (6,5; 8,9)	90,5 (76,3; 125,3)**	5,5 (4,3; 7,8)	16,8 (11,3; 18,2)	19,2 (4,3; 20,1)	287,1 (37,3; 495,6)**

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия по количеству лимфоцитов с экспрессией bcl-2<sup>+</sup> с группами (1), (3); <sup>#</sup> – различия по количеству клеток базального эпителия с экспрессией bcl-2<sup>+</sup> с группами (1), (2), (4); \*\* – различия по количеству клеток базального эпителия с экспрессией p53<sup>+</sup> с группами (1), (3).

Таким образом, иммунофенотип опухолеподобных ЭППР имеет следующие особенности.

- Отек Рейнке: высокое содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>; низкое содержание CD68<sup>+</sup>; высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; низкое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия.

- Миксоидный тип полипов: низкое содержание лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, клеток моноцитарно-макрофагального ряда CD68<sup>+</sup>; высокое содержание p53-позитивных клеток базального эпителия; низкое содержание bcl-2-позитивных лимфоцитов и клеток базального эпителия.

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

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

Особенности иммунного фенотипа тканей различных форм ЭППР предполагают различия и в составе секреторного компонента МАЛТ. В связи с этим, нами проведено исследование цитокинового профиля тканей различных форм ЭППР с помощью мультиплексного анализа. Были изучены концентрации следующих биологически активных веществ, обладающих про- и противовоспалительной, хемотаксической и регуляторной активностью: TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\beta$ , Fractalkine, I-TAC, GM-CSF, TGF- $\beta$ , VEGF.

Результаты детекции провоспалительных цитокинов в тканях различных форм ЭППР представлены в *таблице 11*.

**Таблица 11 – Концентрации цитокинов провоспалительной направленности в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке (ЭППР), в пг/мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
IFN- $\gamma$	4,2 (2,3; 5,3)	3,3 (2,2; 4,1)	4,1 (3,1; 5,3)	2,9 (2,2; 4,4)
TNF- $\alpha$	3,3 (1,5; 5,2)	4,2 (3,1; 5,2)	4,3 (2,5; 5,2)	5,2 (3,6; 6,4)
IL-12p70	5,6 (4,1; 7,1)	4,8 (3,1; 7,5)	5,2 (4,5; 6,6)	5,8 (3,1; 6,4)
IL-17A	4,1 (3,5; 5,4)*	1,6 (1,4; 3,3)	5,0 (4,3; 6,8)*	3,1 (2,1; 4,6)
IL-1 $\beta$	5,5 (2,2; 8,1)	6,3 (5,1; 7,2)	5,0 (4,3; 7,7)	4,1 (2,8; 6,5)
IL-6	1,3 (1,1; 2,2)	1,2 (0,8; 2,1)	1,9 (1,3; 2,7)	1,3 (0,8; 1,8)
IL-23	16,3 (10,6; 19,8)*	7,6 (6,8; 9,2)	19,8 (12,8; 29,9) *	8,9 (7,7; 11,5)

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с (2) и (4).

Исследования показали, что ткани различных форм ЭППР содержат лабораторно определяемые фоновые концентрации провоспалительных цитокинов. При сравнительном анализе нами не обнаружено значимых различий концентраций изучаемых цитокинов среди форм ЭППР, за исключением IL-17A и IL-23, уровни которых в тканях полипов ангиоматозного типа и голосовых узелков были значимо выше таковых в других группах. Известно, что IL-23 секретируется преимущественно активированными дендритными клетками, макрофагами или моноцитами,  $\gamma\delta$ -T-клетками, является ключевым цитокином для поддержания и размножения T-хелперных клеток 17-го типа. Поляризация по фенотипу Th17 запускается TGF- $\beta$  и IL-6, активирующими и стабилизирующими фактор транскрипции



Th17 ROR $\gamma$ t. IL-23 способствует выделению клетками Th17 эффекторных цитокинов: IL-17, IL-21, IL-22, GM-CSF, участвующих в обеспечении барьерного иммунитета слизистых, которые обеспечивают защиту от внеклеточных грибков и бактерий [37, 194].

В свою очередь, IL-17 не только является провоспалительным цитокином, но и обладает регуляторными свойствами в отношении пролиферации, локомоции и дифференцировки мезенхимальных клеток, в том числе и фибробластов [52].

В то же время имеются данные о ключевой роли IL-17, IL-23 в патогенезе ряда аутоиммунных патологий [19, 37].

Повышение концентрации данных цитокинов в тканях «плотных» новообразований может быть связано с выраженным ремоделированием тканей, ангиоматозом, появлением новых тканевых антигенов, что является предпосылками для аутоиммунизации.

Однако, в целом, отсутствие различий по ключевым провоспалительным цитокинам между формами ЭППР, объединенных единым патогенезом, учитывая отсутствие признаков острого воспалительного процесса в тканях голосовых складок, свидетельствует о низком уровне провоспалительной активности иммунных клеток. Тем не менее, увеличение концентрации в тканях «плотных» новообразований IL-17A и IL-23 свидетельствует о повышении секреторной активности иммуноцитов и других клеток (фибробластов, эндотелиоцитов, эпителиоцитов), принимающих непосредственное участие в формировании разных форм ЭППР и способствующих поддержанию и хронизации воспалительных изменений, о чем свидетельствуют морфологические исследования.

Далее нами была проведена оценка концентрации регуляторов хемотаксиса в тканях ЭППР (*таблица 12*). Ткани так называемых «плотных» полипов, к которым относятся ангиоматозный тип полипов и голосовые узелки, а в морфогенезе преобладают пролиферация фибробластов, дилатация капиллярного русла, гиалиноз стромы с выраженным утолщением

суббазальной мембраны, диффузное отложение фибронектина, явления неангиогенеза, содержат наибольшую концентрацию хемокинов, представителей  $\alpha$ -хемокинов (СХС-семейство), в частности, IL-8 и интерфероном- $\gamma$  индуцируемый Т-клеточный альфа хемоаттрактант (I-TAC; семейство CXCL11).

**Таблица 12 – Концентрация хемокинов в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке, в пг/мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
Fractalkine	3,1 (2,2; 3,8) *	8,3 (4,6; 10,1)	4,7 (3,3; 7,3) *	12,5 (8,4; 14,4)
IL-8	13,6 (10,5; 16,2) *	5,2 (3,8; 7,2)	21,3 (12,5; 23,2) *	17,2 (13,6; 21,4)
I-TAC	15,6 (12,1; 17,1) *	4,2 (2,1; 6,5)	11,2 (10,5; 13,6) *	3,7 (2,6; 6,7)
MIP-1 $\alpha$	2,2 (1,8; 6,4) *	12,6 (8,4; 14,3)	6,0 (4,8; 8,8) *	14,3 (12,8; 18,6)
MIP-1 $\beta$	6,5 (4,4; 9,1) *	17,3 (15,1; 20,4)	5,5 (4,3; 10,9) *	14,1 (12,8; 23,5)
MIP-3 $\beta$	3,3 (1,8; 3,2) *	10,2 (8,5; 16,1)	6,9 (4,3; 8,7) *	14,3 (9,8; 18,2)

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с (2) и (4).

Интерлейкин 8 и I-TAC, принадлежащие к семейству  $\alpha$ -хемокинов (СХС-хемокинов), принимают активное участие в активации, миграции и хемотаксисе клеток, способны определять вид клеток, проникающих в ткань из кровотока через эндотелий, а также направление миграции; вырабатываются моноцитами, фибробластами, клетками эндотелия. Наибольшая плотность рецепторов к IL-8 была обнаружена на нейтрофилах, моноцитах/макрофагах и активированных Т-лимфоцитах, после взаимодействия с которыми происходит связывание CXCR1 с G-белком,

приводящее к фосфоинозитидному гидролизу, внутриклеточной мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  и хемотаксису клетки [20].

Рецепторы к I-TAC экспрессируются преимущественно на активированных Th1-лимфоцитах, эндотелиоцитах. Активатором и основным регулятором продукции I-TAC является IFN- $\gamma$ , отрицательный контроль осуществляется противовоспалительными цитокинами IL-4 и IL-10.

I-TAC способствует рекрутингу активированных Th1-лимфоцитов в зону формирования патологии. Имеются данные об ангиостатическом эффекте I-TAC путем секреции CXCR3 на эндотелиальных клетках.

В то же время в образцах тканей миксоидных, или отечных, полипов и отека Рейнке, характеризующихся наличием избыточного жидкостного компонента в интерстиции, утолщением и расширением стенок кровеносных сосудов, истончением и фенестрацией эндотелиальной выстилки, наблюдалось повышение уровня  $\beta$ -хемокинов (CC-хемокинов): MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), MIP-3 $\beta$  (CCL20);  $\delta$ -хемокинов (CX<sub>3</sub>C-хемокинов) – фракталкина (CX3CL1).

Известно, что все представители  $\beta$ -хемокинов являются хемоаттрактантами и активаторами клеток как врожденного (моноцитов, дендритных клеток, НК-клеток), так и адаптивного (Т-лимфоцитов) иммунитета. Профиль рецепторов к CC-хемокинам на клетках может избирательно меняться в зависимости от степени дифференцировки клетки. Так, все Т-лимфоциты экспрессируют CCR1, Th1-CCR5 и CXCR3, Th2 – преимущественно CCR3 [89, 97].

Макрофагальные воспалительные белки – MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\alpha$ ; 3 $\beta$ ), экспрессируясь в основном на активированных моноцитах/макрофагах, реже на фибробластах, клетках эпителия, гладкомышечных клетках сосудов, проявляют свой эффект путем связывания с внеклеточными протеогликанами и лигированием хемокиновых рецепторов CCR1 (лиганд CCL3) и CCR5 (лиганды CCL3 и CCL4). Рецепторы к белкам семейства MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\alpha$ ; 3 $\beta$ ) имеются также на дендритных клетках и тромбоцитах.

Фракталкин – единственный представитель семейства CX<sub>3</sub>C-хемокинов, представлен на моноцитах, эндотелиоцитах как в растворимой, так и в мембраносвязанной с муцинами форме и играет важную роль в хемотаксисе клеток врожденного (моноцитов, НК-клеток) и адаптивного (Т-лимфоцитов) иммунитета [13].

Хроническое перенапряжение голосовых складок либо воздействие токсических факторов, компонентов желчи и соляной кислоты при рефлюксе приводит не только к повышению проницаемости сосудистого эндотелия, накоплению жидкостного компонента в интерстиции и строме голосовых складок, но и к активации клеток, участвующих в тканевом и иммунном гомеостазе, например, фибробластов, моноцитов, эндотелиоцитов.

В строме голосовых складок популяция фибробластов, относящихся к факторам врожденного иммунитета, достаточно многочисленна, способна при активации изменять свой фенотип на воспалительный и увеличивать секреторную активность. Имеются данные о способности фибробластов модулировать паракринную сигнализацию макрофагов во время ранней экспрессии провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) и последующей экспрессии хемокинов и факторов роста (IL-8, I-TAC, MCP-1, TGF- $\beta$ ). Именно фибробласты могут детерминировать степень и продолжительность ответа макрофагов. Морфометрическими исследованиями, выполненными нами ранее, показано, что представительство фибробластов в тканях «плотных» новообразований – ангиоматозных вариантов полипов и голосовых узелков – наибольшее среди всех форм экссудативных поражений пространства Рейнке, вероятно, именно поэтому в данных новообразованиях была выявлена наибольшая концентрация указанных выше хемокинов. При этом нельзя исключать определенную роль в стимуляции фибробластов взаимодействия TLR последних с молекулярными паттернами бактериальной стенки, поскольку гортань расположена на пересечении дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта и микрофлора на просветной поверхности голосовой складки

при повреждении (например, фонотравме) может проникать в эпителий и активировать врожденные механизмы защиты в собственной пластинке [2, 72, 214]. Фибробласты одними из первых встречаются с инфекционными агентами, поскольку конститутивно экспрессируют TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9.

Зориной А.И., с соавт., Шурыгиной И.А., с соавт., Jafarnejad M., et al. описана гипотеза об изменении фенотипа фибробластов на воспалительный при повреждении микрососудов и воздействии первичных медиаторов воспаления, таких как циклооксигеназа-2, HIF-1 $\alpha$ , протеазы (MMP-2, -9), белки (фибронектин, декорин), способных менять сигнализацию и активировать факторы врожденного иммунитета, например, дендритные клетки, макрофаги, НК-клетки [2, 72, 216]. Подобный механизм описан также и при «мягких» полипах (миксоидный тип) и отеке Рейнке, в супернатанте которых нами зафиксировано повышение концентрации СС-хемокинов – MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\beta$ ) и фракталкина, которые продуцируются преимущественно моноцитами, эндотелиоцитами, что отражает включение реакций иммунного реагирования при формировании данной патологии.

Изучение секреторной активности основных представителей стромы голосовых складок, в частности, представителей дифферона фибробластов, важно также с точки зрения участия последних 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 и впоследствии – к профессиональной непригодности.

Таким образом, при изучении экспрессии хемокинов в тканях экссудативных поражений пространства Рейнке были зафиксированы особенности, заключающиеся в преобладании содержания СХС-хемокинов в тканях «плотных» новообразований и повышении концентрации СС-хемокинов и СХ<sub>3</sub>С-хемокинов в тканях «мягких» новообразований,

содержащих большую долю жидкостного компонента в строме. При этом следует учесть, что концентрация цитокинов стандартизирована и пересчитана на 1 мг белка. Подобное распределение содержания хемокинов может свидетельствовать о преобладающем значении клеток-продуцентов при формировании отдельных видов новообразований голосовых складок.

Хронический воспалительный процесс в тканях, как правило, характеризуется сочетанием цитокинов различной направленности действия, в том числе противовоспалительной и регуляторной. В связи с этим, нами изучены концентрации противовоспалительных цитокинов и ростковых факторов в тканях ЭППР (таблица 13).

**Таблица 13 – Уровни противовоспалительных и регуляторных цитокинов и факторов роста в тканях ЭППР, в пг/мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
Цитокины с противовоспалительными и регуляторными свойствами				
IL-10	6,3 (4,2; 8,8)	13,2 (10,6; 15,1) *	5,9 (5,3; 9,3)	14,6 (11,4; 17,4) *
IL-13	7,6 (5,5; 9,2)	6,2 (5,8; 7,2)	5,6 (4,5; 8,2)	7,2 (5,6; 9,4)
IL-7	5,6 (4,1; 7,1)	4,2 (3,1; 5,5)	5,2 (3,5; 7,6)	6,7 (4,6; 8,7)
IL-4	4,2 (2,8; 5,4)	3,6 (2,4; 6,3)	4,0 (2,8; 6,8)	5,3 (3,8; 8,6)
IL-5	7,5 (4,9; 8,1)	6,3 (5,1; 9,4)	7,5 (6,3; 9,9)	6,1 (5,8; 8,5)
IL-2	3,3 (1,8; 5,2)	5,2 (2,5; 6,1)	4,9 (2,3; 6,7)	5,1 (4,8; 8,2)
IL-21	2,2 (1,6; 3,6)	4,2 (2,2; 5,5)	4,1 (2,6; 5,8)	3,6 (2,8; 4,9)

Показатель	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
Факторы роста				
GM-CSF	8,8 (6,2; 10,2)	14,6 (10,6; 21,3) *	10,6 (8,8; 11,6)	23,5 (12,3; 28,6) *
VEGF	43,7 (31,8; 55,2) *	18,2 (13,2; 21,3)	34,9 (28,3; 46,7) *	15,1 (12,8; 18,2)
TGF- $\beta$	56,9 (35,2; 72,6) *	22,8 (17,6; 34,6)	49,4 (38,3; 62,3) *	19,5 (15,6; 24,6)

Примечание: \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с (2) и (4).

Оценка концентрации в тканях ЭППР противовоспалительных факторов показала повышение концентрации IL-10 в тканях «мягких» новообразований, а именно в полипах миксоидного, или отечного, типа и при отеке Рейнке, в сравнении с тканями «плотных» новообразований.

Известно, что IL-10 секретируется активированными моноцитами/макрофагами и обладает мощным противовоспалительным и иммуносупрессивным эффектом, способен 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.

В то же время IL-10 активирует Т-хелперы 2-го типа и синтез продуцируемых ими цитокинов – IL-4, IL-10, способствуя переключению иммунного ответа с Th1 на Th2. При этом IL-10 обладает свойствами ауторегулятора собственной активности, подавляя синтез мРНК.

На этапах репарации IL-10 оказывает лимитирующее воздействие на процессы ангиогенеза, угнетая продукцию проангиогенных факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и MMP-9.

Исследование концентрации факторов роста в тканях ЭППР показало интересные и вполне закономерные особенности. В тканях «плотных»

новообразований, где наиболее активно, согласно морфологическим исследованиям, происходят процессы ремоделирования тканей, был зафиксирован рост уровней фактора роста эндотелия (VEGF), трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ); напротив, в тканях «мягких» новообразований было показано увеличение концентрации гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), известного, помимо гемопоэтической активности, способностью индуцировать девиацию иммунного ответа в сторону Th1-типа [32]. При данных формах ЭППР ткани голосовых складок наиболее страдают в результате гипоксически-ишемических процессов в силу механического сдавления подлежащих тканей отечной жидкостью. Поскольку ткани «мягких» новообразований содержат низкое (в сравнении с «плотными» формами ЭППР) количество клеток моноцитарно-макрофагальной линии, на фоне высокой экспрессии p53 на клетках базального эпителия повышение в тканях уровня GM-CSF может быть оправдано с точки зрения пополнения популяции данной клеточной линии и повышения выживаемости клеток в условиях гипоксии.

Достаточно обоснованным можно признать повышение концентрации VEGF и TGF- $\beta$  в тканях полипов ангиоматозного типа и голосовых узелков, поскольку именно в них происходил активный неоангиогенез. Многочисленные модели демонстрируют активирующее действие VEGF на процессы ангиогенеза *in vivo* и пролиферации изолированных эндотелиоцитов артерий, вен и лимфатических сосудов *in vitro* [22, 171]. Процессы ремоделинга в данных новообразованиях протекают более активно и сопровождаются секреторной активностью фибробластов, при этом не только активируются коллагенообразование, секреция матриксных металлопротеиназ, но и повышается уровень гипоксией индуцируемого фактора 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), который характеризуется повышающей регуляцией в отношении экспрессии VEGF [22, 203].

Активация секреции Th3-типа TGF- $\beta$ , супрессора продукции провоспалительных цитокинов, одного из основных факторов, участвующих в



ремоделинге тканей на фоне, например, хронического воспалительного процесса, вполне закономерна. При различных структурных перестройках экстрацеллюлярного матрикса либо его повреждении ряд внеклеточных и трансмембранных протеинов (например, фибронектин) способен модифицировать активность клеток-продуцентов в отношении продукции TGF- $\beta$ , в то же время белки матрикса декорин и бигликан могут ингибировать активность TGF- $\beta$  [126]. Кроме того, TGF- $\beta$  способен активировать гены, вовлеченные в организацию цитоскелета, формирование и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, метаболизм протеинов, сигнальную систему клетки, пролиферацию и генную транскрипцию, путем передачи внутриклеточных регуляторных сигналов, катализируя фосфорилирование Smad-белков в клетках-мишенях [126]. Также TGF- $\beta$  является не только индуктором роста фибробластов, но и полифункциональным модулятором клеточного роста и обновления – путем ингибиции клеточного цикла в фазе G1 и способности к индукции апоптоза. TGF- $\beta$  совместно с IL-2 выступает индуктором трансформации Foxp3<sup>+</sup> Treg-лимфоцитов из наивных клеток-предшественников [2].

Таким образом, нами показано, что мукозоассоциированная лимфоидная ткань региона гортани и голосовых складок активно участвовала в реакциях иммунного реагирования и при разных формах ЭППР имела особенности иммунофенотипа. Поддержание клеточного гомеостаза МАЛТ гортани зависит как от согласованной работы ингибиторов и индукторов апоптоза и может изменяться в зависимости от характера патологического процесса, так и от секреторной активности клеток. В целом, полученные нами данные о содержании цитокинов различной функциональной направленности, хемокинов и факторов роста в тканях различных форм ЭППР позволяют сделать заключение об их важнейшей роли в формировании патологии и процессах ремоделирования тканей.

### **3.1.3 – Оценка показателей свободнорадикального окисления в тканях голосовых складок при различных формах экссудативных поражений пространства Рейнке**

Хроническая профессиональная фоновая травма слизистой голосовых складок и воздействие токсических факторов способствуют развитию хронического воспаления в тканях, элементы которого зафиксированы морфологически и описаны в разделе 3.1.1, с последующим ремоделированием и дегенерацией. При развитии хронического воспалительного процесса в тканях голосовых складок важнейшую роль в процессах вторичной альтерации играют продукты свободнорадикального окисления (СРО), избыточно образующиеся в митохондриях активированных иммунокомпетентных клеток, эндотелиоцитах и являющиеся основным триггером клеточного окислительного стресса. В то же время имеются данные о сигнальной роли АФК, способных принимать и транслировать внутриклеточные транскрипционные сигналы [10, 23, 38, 158].

Для оценки возможного вклада продуктов СРО в развитие хронического воспалительного процесса в тканях голосовых складок при формировании разных форм ЭППР проведено определение содержания метаболитов ПОЛ и ОМБ в биоптатах новообразований.

Сравнительная оценка содержания продуктов ПОЛ в тканях ЭППР показала значимое увеличение в тканях «мягких» новообразований количества диеновых конъюгатов в гептановой и изопропанольной фазе липидного экстракта и оснований Шиффа в гептановой фазе в сравнении с тканями «плотных» ЭППР, что свидетельствует о преобладании продукции АФК в тканях «мягких» новообразований с преобладанием жидкостного компонента, усиливающего гипоксически-ишемические изменения, способствующие развитию окислительного клеточного стресса (*таблица 14*).

**Таблица 14 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в биоптатах голосовых складок при ЭППР, в е. и. о. [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Группы	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
ДК (г)	0,68 (0,54; 0,72)	0,82 (0,70; 0,86) *	0,61 (0,58; 0,66)	0,79 (0,72; 0,88) *
КДиСТ (г)	0,24 (0,22; 0,34)	0,32 (0,28; 0,36)	0,26 (0,23; 0,30)	0,25 (0,22; 0,32)
ШО (г)	0,03 (0,01; 0,04)	0,20 (0,08; 0,22) *	0,04 (0,02; 0,08)	0,30 (0,13; 0,35) *
ДК (и)	0,56 (0,48; 0,62)	0,78 (0,64; 0,81) *	0,60 (0,52; 0,63)	0,84 (0,69; 0,92) *
КДиСТ (и)	0,24 (0,23; 0,34)	0,28 (0,22; 0,32)	0,32 (0,28; 0,36)	0,28 (0,30; 0,36)
ШО (и)	0,05 (0,02; 0,08)	0,12 (0,07; 0,21)	0,06 (0,02; 0,20)	0,14 (0,06; 0,19)

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с (1) и (3); е. и. о. – единицы индексов окисления, (г) – гептановая фаза, (и) – изопропанольная фаза, ДК – диеновые конъюгаты, КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – Шиффовы основания.

Оценка показателей окислительной модификации белков, регистрируемых в спонтанном режиме в области видимого и ультрафиолетового спектра, выявила ряд различий между гистоморфологическими типами ЭППР (таблица 15). Так, в тканях «мягких» новообразований в сравнении с «плотными» было увеличено суммарное количество карбонильных производных белков – необратимых продуктов окислительного стресса, формирующихся за счет окисления нескольких аминокислотных остатков, а также взаимодействия с продуктами перекисного окисления липидов и редуцирующими сахарами [35]. Анализ содержания компонентов ОМБ показал повышенное накопление альдегидов, регистрируемых как в области УФ-света, так и в области видимого света, в тканях «мягких» новообразований, что привело к преимущественному увеличению суммарного количества динитрофенилгидразонов,

регистрируемых в области ультрафиолетового спектра, нейтрального характера. Область УФ-спектра отражает накопление карбонильных производных нейтрального характера, а видимая – основного характера, то есть оценка суммарного содержания карбониллов в области УФ-света и в области видимого света позволяет оценить природу динитрофенилгидразонов.

**Таблица 15 – Показатели окислительной модификации белков в спонтанном режиме в биоптатах голосовых складок при ЭППР, в у.е./мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Группы	ЭППР			
	Полипы голосовых складок		Узелки голосовых складок n = 13 (3)	Отек Рейнке n = 19 (4)
	Ангиоматозный тип n = 22 (1)	Миксоидный тип n = 18 (2)		
S <sub>АДНФГ uv</sub>	278,3 (259,3; 286,8)	316,3 (304,2; 322,5) *	266,5 (228,4; 278,6)	318,4 (312,2; 329,8) *
S <sub>АДНФГ vs</sub>	29,6 (24,4; 31,6)	34,6 (32,4; 48,5) *	24,6 (21,8; 29,2)	36,6 (32,4; 46,4) *
S <sub>КДНФГ uv</sub>	56,7 (52,4; 62,1)	60,4 (58,9; 64,1)	62,7 (54,7; 66,1)	63,2 (55,9; 67,8)
S <sub>КДНФГ vs</sub>	8,6 (7,2; 9,4)	9,2 (7,3; 10,1)	6,8 (4,7; 8,2)	6,9 (5,6; 8,4)
S <sub>ОМБ спонт.</sub>	396,6 (352,1; 406,6)	421,7 (410,1; 458,7) *	372,8 (321,5; 388,5)	430,1 (412,5; 454,21) *
S <sub>АДНФГ</sub>	309,8 (280,1; 321,2)	347,8 (332,1; 382,1) *	290,8 (260,1; 310,2)	350,8 (348,1; 382,1) *
S <sub>КДНФГ</sub>	63,7 (58,2; 71,6)	69,6 (64,3; 74,8)	67,2 (62,3; 74,5)	68,4 (60,1; 74,2)
S <sub>ДНФГ uv</sub>	332,4 (309,2; 346,8)	362,5 (346,1; 389,6)	328,5 (280,2; 342,6)	384,1 (366,2; 398,4) *
S <sub>ДНФГ vs</sub>	36,4 (28,9; 41,1)	44,1 (39,1; 58,2)	31,6 (26,1; 37,4)	42,1 (37,8; 55,1)

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с (1) и (3); vs – видимый спектр, uv – ультрафиолетовый спектр, S – количество, ДНФГ – динитрофенилгидразоны, АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны.

### **3.2 – Применение топической озонотерапии в раннем послеоперационном периоде после хирургического лечения экссудативных поражений пространства Рейнке**

#### **3.2.1 – Изменения клиничко-инструментальных и акустических параметров на фоне применения топической озонотерапии в послеоперационном периоде**

При визуальном осмотре зоны полипозно измененных тканей голосовых складок пациентов основной группы до оперативного лечения клинических признаков острого воспалительного процесса отмечено не было (*рисунок 14*).



**Рисунок 14 – Полипы голосовых складок, двусторонние, до оперативного лечения**

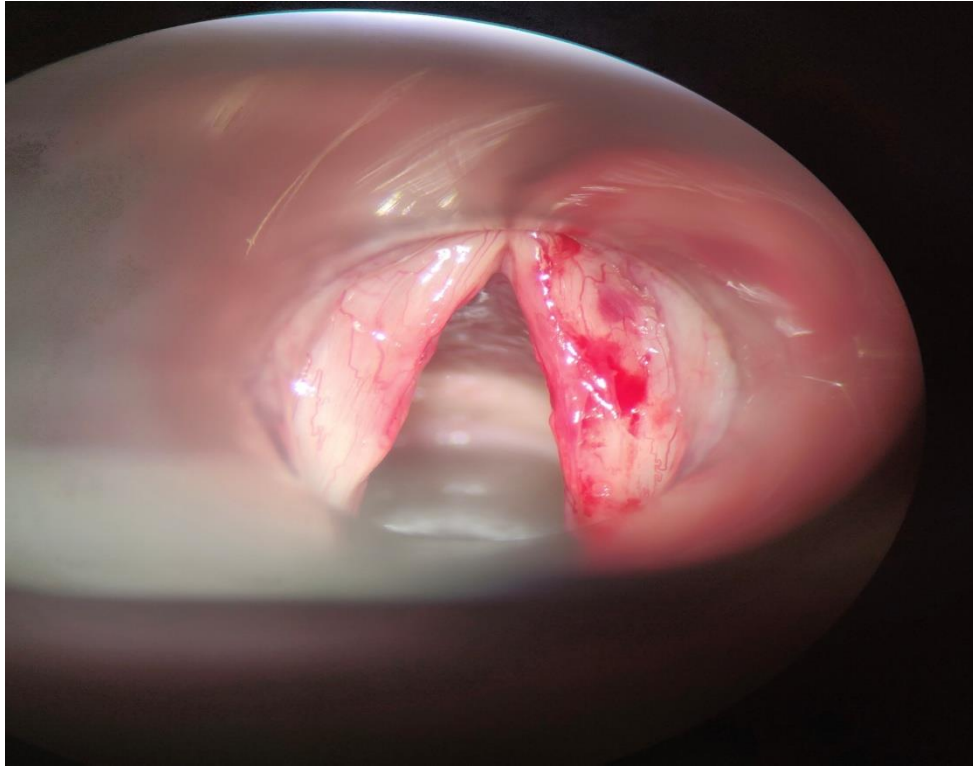
*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ .

Всем пациентам основной группы с ЭППР было проведено хирургическое удаление новообразований с помощью фибробронхоскопа Olympus TУPER150 (Япония) с интегрированным CO<sub>2</sub> лазером Lumenis AcuPulseSurgTouch (Израиль) по стандартной технологии. После оперативного вмешательства все пациенты методом простой рандомизации были разделены на две равновеликие подгруппы: 2а (n=36) – пациенты,

получающие ежедневно однократно ингаляционную терапию 0,9% раствором хлорида натрия, и 26 (n = 36) – пациенты, которым дополнительно проводилась локальная озонотерапия в виде орошений голосовых складок озонированным оливковым маслом. Всем пациентам рекомендован голосовой покой и воздержание от курения.

Учитывая общность механизмов патогенеза ЭППР и однотипность хирургического лечения, оценку эффективности локальной озонотерапии в послеоперационном периоде проводили без учета гистологической структуры ЭППР. Определение биохимических и иммунологических показателей осуществляли в слизистом отделяемом с поверхности голосовых складок, отобранном с помощью микроаспиратора при проведении непрямой ларингоскопии.

При клинико-инструментальном исследовании в раннем послеоперационном периоде у всех пациентов была отмечена воспалительная реакция в зоне операции (*рисунок 15*). Признаки реактивного воспалительного процесса, обусловленного хирургическим вмешательством, были представлены гиперемией, отеком голосовых складок, налетами, преимущественно фибринозного характера, выраженной сосудистой инъекцией, неровными (вогнутыми) краями голосовых складок при фонации, болевыми ощущениями разной степени выраженности, не требующими приема анальгетиков.



**Рисунок 15 – Состояние голосовых складок непосредственно после полипэктомии и пластики тканей**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув. ×2.

Клиническую оценку состояния раневой поверхности в подгруппах 2а и 2б проводили в динамике на 3-и, 7-е и 10-е сутки по следующим критериям: выраженность гиперемии слизистой оболочки, наличие отека, инфильтрации тканей, наличие и характер налетов, выраженность сосудистой реакции, боль при глотании. Оценка проводили по балльной шкале от 0 до 3, с подсчетом суммарного балла: 0 баллов – симптом отсутствует, 1 балл – симптом незначительно выражен, 2 балла – умеренно выражен, 3 балла – симптом значительно выражен (*таблица 16*).

**Таблица 16 – Характер реактивных изменений в динамике раневого процесса на фоне озонотерапии, в баллах [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	ЭППР, группа 2						
	До хирургического удаления n = 72	Сроки после хирургического удаления новообразований, сутки					
		3-и		7-е		10-е	
		Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36	Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36	Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36
Гиперемия	0,2 (0,1; 0,3)	3,0 (2,8; 3,0) <sup>#</sup>	2,9 (2,7; 3,0) <sup>#</sup>	2,2 (2,1; 2,5) <sup>#</sup>	1,5 (1,3; 1,8) <sup>*#</sup>	1,6 (1,4; 2,0) <sup>#</sup>	0,8 (0,6; 1,1) <sup>**#</sup>
Наличие отека тканей	0,1 (0,0; 0,2)	3,0 (2,9; 3,0) <sup>#</sup>	2,8 (2,7; 2,9) <sup>#</sup>	2,4 (2,2; 2,6) <sup>#</sup>	2,0 (1,8; 2,2) <sup>*#</sup>	0,5 (0,3; 0,7) <sup>#</sup>	0,2 (0,1; 0,3) <sup>**</sup>
Наличие фибринозных налетов	0,0 (0,0; 0,0)	3,0 (2,9; 3,0) <sup>#</sup>	3,0 (2,9; 3,0) <sup>#</sup>	2,1 (1,8; 2,4) <sup>#</sup>	1,3 (1,1; 1,4) <sup>*#</sup>	1,2 (0,8; 1,3) <sup>#</sup>	0,8 (0,5; 1,0) <sup>**#</sup>
Выраженность сосудистой реакции	0,8 (0,3; 1,1)	3,0 (2,8; 3,0) <sup>#</sup>	3,0 (2,8; 3,0) <sup>#</sup>	2,5 (2,3; 2,7) <sup>#</sup>	1,5 (1,2; 1,7) <sup>*#</sup>	1,3 (1,1; 1,5) <sup>#</sup>	0,8 (0,7; 1,1) <sup>**</sup>
Инфильтрация тканей	0,2 (0,1; 0,4)	3,0 (2,8; 3,0) <sup>#</sup>	3,0 (2,7; 3,0) <sup>#</sup>	2,6 (2,4; 2,8) <sup>#</sup>	2,2 (2,0; 2,4) <sup>*#</sup>	1,6 (1,4; 1,8) <sup>#</sup>	0,9 (0,6; 1,0) <sup>**#</sup>
Боль при глотании	0,6 (0,4; 0,8)	3,0 (3,0; 3,0) <sup>#</sup>	3,0 (2,8; 3,0) <sup>#</sup>	2,1 (1,7; 2,2) <sup>#</sup>	1,3 (1,1; 1,5) <sup>*#</sup>	1,1 (0,8; 1,3) <sup>#</sup>	0,5 (0,3; 0,8) <sup>**</sup>

*Примечание:* значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия: <sup>#</sup> – с группой до хирургического лечения; <sup>\*</sup> – с подгруппой 2а на 7-е сутки; <sup>\*\*</sup> – на 10-е сутки.



На 3-е сутки после хирургического вмешательства в подгруппах 2а и 2б было отмечено высокое суммарное количество баллов, отражающее максимальную выраженность клинических признаков воспалительного процесса в области операционной раны. На 7-е сутки послеоперационного течения в подгруппе 2б, получающей локальную озонотерапию, все изучаемые показатели, отражающие воспалительные изменения в ране, были значимо снижены в сравнении с подгруппой 2а, однако не достигали уровня, определенного у пациентов до момента хирургического лечения. На 10-е сутки озонотерапии было обнаружено практически полное отсутствие отечных явлений, выраженности сосудистой реакции и болевых субъективных ощущений при глотании и фонации, что сравнимо с состоянием до оперативного вмешательства. При этом зафиксировано значимое снижение всех изучаемых клинических критериев относительно подгруппы 2а, что отражает положительное влияние озона и его дериватов на динамику воспалительных изменений в ране. В научной литературе приведено достаточное количество клинических данных, подтверждающих противовоспалительное действие озона и его дериватов при различной патологии [43-45, 49, 74, 85, 86, 146, 163, 170, 182]. Противовоспалительный эффект озона обусловлен прежде всего способностью пероксида озона, 4-гидроксиноненаля проникать в цитоплазму иммунокомпетентных клеток и модулировать действие факторов транскрипции генов Nrf2, NF- $\kappa$ B и др. [54, 57].

Субъективную оценку качества голоса определяли согласно следующим методикам: по степени охриплости голоса, оцениваемой по 5-балльной шкале N. Yanagihara [224], и определению длительности фонационного выдоха (время максимальной фонации), позволяющей определить состояние нервно-мышечного аппарата голосовых складок, – снижение данного параметра свидетельствует о недостаточном смыкании голосовых складок [15]. Характеристика акустических феноменов у пациентов в динамике послеоперационного течения представлена в *таблице 17*.

**Таблица 17 – Акустические субъективные характеристики голоса в динамике раневого процесса на фоне озонотерапии, Ме (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР, группа 2						
		До хирургического удаления n = 72	Сроки после хирургического удаления новообразований, сутки					
			3-и		7-е		10-е	
			Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36	Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36	Подгруппа 2а n = 36	Подгруппа 2б n = 36
Степень охриплости голоса, баллы	0,1 (0,1; 0,1)	3,1 (2,8; 3,6) <sup>ж</sup>	4,1 (3,5; 4,4) <sup>ж#</sup>	3,9 (3,6; 4,3) <sup>ж#</sup>	2,5 (2,1; 2,8) <sup>ж</sup>	2,1 (1,8; 2,5) <sup>ж#*</sup>	1,8 (1,6; 2,0) <sup>ж#</sup>	1,2 (1,0; 1,4) <sup>ж#**</sup>
Время максимальной фонации, с	24,4 (22,1; 26,3)	12,6 (10,4; 13,4) <sup>ж</sup>	9,2 (8,5; 9,4) <sup>ж#</sup>	10,1 (8,6; 10,4) <sup>ж#</sup>	14,2 (12,3; 15,0) <sup>ж</sup>	16,5 (15,2; 18,9) <sup>ж#*</sup>	18,8 (17,8; 20,1) <sup>ж#</sup>	22,1 (20,2; 24,2) <sup>#**</sup>

*Примечание:* различия между группами определяли согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ): <sup>ж</sup> – с группой 1; <sup>#</sup> – с группой до хирургического лечения; <sup>\*</sup> – с подгруппой 2а на 7-е сутки; <sup>\*\*</sup> – на 10-е сутки.

Анализ данных акустического исследования показал значимые различия в степени охриплости голоса и снижении ВМФ у всех пациентов с ЭППР до хирургического лечения в сравнении со здоровыми лицами. На 3-е сутки послеоперационного периода значимых положительных изменений со стороны изучаемых акустических параметров не было зафиксировано, при этом в подгруппе 2а более 70% пациентов имели тяжелую степень охриплости, в подгруппе 2б число таких пациентов составило 57%, а показатель ВМФ в обеих подгруппах значимо снизился в сравнении с показателем до операции, что обусловлено альтерацией тканей голосовых складок при проведении оперативного вмешательства.

На 7-е сутки в подгруппе 2б, получающей озонотерапию, зафиксировали значимое снижение степени охриплости голоса и увеличение ВМФ в сравнении с аналогичными показателями подгруппы 2а и определенными до хирургического вмешательства.

На 10-е сутки степень охриплости голоса в подгруппе 2б значимо снизилась в сравнении с подгруппой 2а, время максимальной фонации увеличилось в сравнении с подгруппой 2а (до показателя здоровых лиц).

Таким образом, нами было продемонстрировано положительное влияние озона и его дериватов, применяемого в виде озонированного оливкового масла, в раннем послеоперационном периоде на динамику клинических проявлений течения раневого процесса и субъективных акустических показателей качества голоса.

### **3.2.2 – Влияние топической озонотерапии на изменение уровней про- и противовоспалительных цитокинов, показателей редокс-статуса в раннем послеоперационном периоде**

Альтерация тканей голосовых складок во время оперативного удаления новообразований запускает процесс реактивного воспаления, вызванного структурными, физико-химическими, обменными нарушениями, иммунными реакциями в ране с выделением медиаторов воспаления. В течение первых минут после альтерации появляются первые признаки сосудистой реакции,

приводящие к гиперемии и увеличению проницаемости сосудов, преимущественно посткапиллярных венул; позднее наблюдаются хемотаксис и адгезия лейкоцитов, аккумуляция нейтрофилов и макрофагов – основных продуцентов биологически активных веществ (БАВ) и активных форм кислорода (АФК), детерминирующих интенсивность процессов воспаления в ране.

Применение озонотерапии в раннем послеоперационном периоде после удаления новообразований основано на мультимодальных эффектах озона, включающих модуляцию синтеза про- и противовоспалительных цитокинов, ферментов антиоксидантной защиты, шоковых протеинов, что в целом позволяет проявлять иммуномодулирующие, про- и антиоксидантные, антигипоксические свойства, позитивно влиять на репаративные процессы в ране. В связи с этим, для оценки влияния топической озонотерапии на динамику воспалительных изменений в раневой области голосовых складок на следующем этапе нами было исследовано содержание ряда провоспалительных, противовоспалительных, регуляторных цитокинов, факторов роста и продуктов СРО в слизистом отделяемом голосовых складок до хирургического лечения и в динамике послеоперационного периода. Забор слизистого отделяемого на 3-и сутки после оперативного вмешательства не осуществлялся во избежание дополнительной травматизации тканей голосовых складок. Поскольку объем слизистого отделяемого голосовых складок, извлекаемый с помощью микроаспиратора, крайне мал и составляет не более 10–20 мкл, возникают закономерные сложности в проведении многокомпонентных исследований. Поэтому для определения концентрации цитокинов нами был проведен высокотехнологичный мультиплексный анализ, позволяющий проводить определение биологически активных веществ в минимальном объеме секрета.

Содержание основных провоспалительных цитокинов и хемокинов в слизистом секрете голосовых складок на 7-е и 10-е сутки после

хирургического удаления новообразований на фоне озонотерапии представлено в *таблице 18*.

В группе пациентов с ЭППР до хирургического лечения показатели провоспалительных цитокинов и хемокинов не имели значимых различий с группой здоровых лиц, что свидетельствует об отсутствии признаков острого воспалительного процесса в тканях голосовых складок и подтверждается клиническими наблюдениями.

На фоне озонотерапии на 7-е сутки послеоперационного периода при наблюдаемых клинических признаках стихания воспалительных явлений в зоне оперативного вмешательства имело место значимое снижение уровней TNF- $\alpha$  и IL-6, а также хемокинов IL-8 и I-TAC в слизистом отделяемом в сравнении с подгруппой 2а (сравнимы с показателями здоровых лиц).

На 10-е сутки все изучаемые параметры подгруппы 2б, получающей озонотерапию, были зафиксированы на уровне показателей здоровых лиц.

Противовоспалительное действие озона модулируется путем запуска в клетке ряда механизмов: регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза, подавления активности провоспалительных генов (NF- $\kappa$ B), подавления участия РНК-полимеразы II в транскрипции генов провоспалительных цитокинов [119]. Доказано, что озон и продукты его метаболизма подавляют активность NF- $\kappa$  $\beta$  – опосредованную продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23 [131, 171, 206]. В свою очередь, понижающая регуляция в отношении хемокинов, в частности IL-8, способствует ограничению миграции и накопления в тканях нейтрофилов, основных источников АФК, инициирующих процессы СРО, тем самым сокращая площадь вторичной альтерации и способствуя ускорению сроков редукции воспалительных явлений [161].

Исследование содержания продуктов ПОЛ и ОМБ в слизистом отделяемом голосовых складок в динамике послеоперационного периода в условиях озонотерапии представлено в *таблицах 19, 20*.

**Таблица 18 – Содержание провоспалительных цитокинов и хемокинов в слизистом отделяемом голосовых складок на фоне озонотерапии, в пг/мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР				
		Группа 2 До хирургического 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-γ	5,3 (4,3; 6,4)	6,4 (4,2; 9,1)	18,9 (12,1; 23,3) <sup>*,**</sup>	12,7 (10,2; 14,3) <sup>*,**</sup>	11,3 (8,5; 12,5) <sup>*</sup>	7,1 (5,5; 8,3) <sup>#</sup>
TNF-α	2,6 (1,4; 4,2)	3,8 (1,3; 4,7)	14,1 (10,5; 16,1) <sup>*,**</sup>	9,2 (6,6; 11,4) <sup>*,**, #</sup>	6,8 (4,7; 8,9) <sup>*,**</sup>	4,1 (2,8; 5,1) <sup>#</sup>
IL-1β	4,8 (3,2; 6,1)	5,9 (4,6; 8,2)	15,0 (12,3; 17,7) <sup>*,**</sup>	12,1 (10,3; 14,2) <sup>*,**</sup>	9,9 (8,2; 10,4) <sup>*,**</sup>	6,8 (5,8; 7,2) <sup>#</sup>
IL-6	2,3 (1,4; 4,2)	3,2 (1,3; 4,6)	9,3 (6,3; 10,1) <sup>*,**</sup>	5,3 (4,8; 7,8) <sup>*,**, #</sup>	4,1 (3,8; 6,2)	4,2 (3,2; 5,1)
IL-8	13,1 (10,4; 16,2)	12,4 (10,8; 15,2)	24,3 (20,5; 26,2) <sup>*,**</sup>	16,7 (14,1; 19,3) <sup>#</sup>	18,6 (16,9; 19,1) <sup>*,**</sup>	14,6 (12,3; 15,8) <sup>#</sup>
I-TAC	14,4 (11,6; 16,2)	15,3 (12,4; 16,5)	19,2 (18,1; 23,2) <sup>*,**</sup>	13,4 (8,6; 15,7) <sup>#</sup>	16,3 (14,6; 17,8)	12,3 (9,6; 14,3) <sup>#</sup>

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

**Таблица 19 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в слизистом отделяемом голосовых складок в условиях озонотерапии, в е. и. о. [Ме (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР				
		Группа 2 До хирургического 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
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; 0,25)	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) #

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с группой 1; \*\* – с группой 2; # – с подгруппой 2а; е. и. о. – единицы индексов окисления; (г) – гептановая фаза; (и) – изопропанольная фаза; ДК – диеновые конъюгаты; КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены; ШО – Шиффовы основания.

**Таблица 20 – Показатели окислительной модификации белков в спонтанном режиме в слизистом отделяемом голосовых складок в условиях озонотерапии, в у. е./мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР				
		Группа 2 До хирургического 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
S <sub>АДНФГ uv</sub>	224,6 (187,9; 262,3)	253,8 (121,9; 284,6)	438,7 (368,1; 455,1) *,**	261,0 (183,1; 298,1) <sup>#</sup>	418,8 (369,6; 452,6) *,**	254,3 (236,3; 284,5) <sup>#</sup>
S <sub>АДНФГ vs</sub>	11,4 (8,1; 16,3)	12,3 (6,3; 15,3)	33,2 (24,5; 41,6) *,**	16,5 (10,6; 20,3) <sup>#</sup>	26,5 (18,6; 34,5) *,**	11,3 (8,6; 15,2) <sup>#</sup>
S <sub>КДНФГ uv</sub>	42,1 (28,2; 65,7)	40,6 (24,4; 55,7)	75,9 (62,7; 95,5) *,**	44,6 (28,6; 61,0) <sup>#</sup>	59,7 (55,4; 67,2) <sup>*</sup>	40,3 (24,1; 54,3) <sup>#</sup>
S <sub>КДНФГ vs</sub>	2,8 (1,2; 4,1)	3,0 (0,9; 3,8)	6,2 (4,8; 9,7) *,**	4,3 (1,3; 5,1) <sup>#</sup>	5,4 (4,6; 7,4) *,**	3,3 (1,2; 3,5)
S <sub>ОМБ спонт.</sub>	286,2 (227,1; 358,3)	312,0 (192,0; 433,7)	562,1 (446,7; 648,2) *,**	328,8 (284,2; 430,1) <sup>#</sup>	458,7 (362,3; 471,0) *,**	292,3 (254,3; 321,5) <sup>#</sup>
S <sub>АДНФГ</sub>	238,7 (198,3; 278,1)	265,9 (159,3; 346,6)	481,4 (375,4; 522,8) *,**	278,3 (189,1; 356,9) <sup>#</sup>	312,4 (241,6; 387,9) <sup>*</sup>	244,1 (195,3; 259,5) <sup>#</sup>
S <sub>КДНФГ</sub>	45,2 (29,4; 70,8)	44,9 (32,1; 73,8)	82,3 (74,1; 109,4) *,**	49,6 (18,8; 83,7) <sup>#</sup>	67,8 (55,4; 74,6)	44,6 (20,7; 55,6) <sup>#</sup>
S <sub>ДНФГ uv</sub>	266,4 (215,1; 328,3)	289,8 (210,0; 323,3)	518,5 (428,5; 556,3) *,**	306,1 (216,3; 358,2) <sup>#</sup>	478,6 (354,6; 512,3) *,**	298,5 (246,3; 312,6) <sup>#</sup>
S <sub>ДНФГ vs</sub>	14,7 (9,4; 21,2)	16,5 (9,8; 23,5)	40,3 (28,5; 51,2) *,**	21,3 (11,2; 25,4) <sup>#</sup>	30,4 (21,4; 37,9) *,**	15,6 (13,2; 18,6) <sup>#</sup>

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с группой 1; \*\* – с группой 2; # – с подгруппой 2а; vs – видимый спектр; uv – ультрафиолетовый спектр; S – количество; ДНФГ – динитрофенилгидразоны; АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны.



Исследование продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в слизистом отделяемом, взятом с голосовых складок на 7-е сутки после оперативного удаления ЭППР, в подгруппе 2а, получающей только ингаляции 0,9% раствора натрия хлорида, показало значимое повышение концентрации первичных диеновых конъюгатов (ДК), вторичных кетодиенов и сопряженных триенов (КДиСТ) и конечных оснований Шиффа (ШО) продуктов окислительной модификации липидов, регистрируемых как в гептановой фазе, содержащей преимущественно триглицериды, так и в изопропанольной, аккумулирующей фосфолипиды клеточных мембран, в сравнении со здоровыми лицами и показателями группы 2 (до проведения хирургического лечения).

На фоне проведения локальной озонотерапии на 7-е сутки в слизистом отделяемом пациентов подгруппы 2б зафиксированы значимо более низкие концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта в сравнении с показателями подгруппы 2а и отсутствие различий с аналогичными показателями до лечения и в группе здоровых лиц. Содержание конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе значимо снизилось в сравнении с подгруппой 2а, однако не достигало уровня показателей контрольной группы. Содержание в слизистом секрете оснований Шиффа в изопропанольной фазе снизилось, но не достигло уровней, полученных до оперативного вмешательства и в группе здоровых лиц.

Десятые сутки характеризовались снижением до значений здоровых лиц и показателей, полученных до хирургического вмешательства, первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в подгруппе 2б; в то же время в подгруппе 2а значений контрольной группы здоровых лиц достиг лишь показатель первичных продуктов ПОЛ, регистрируемый как в гептановой, так и в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы.

Показатели окислительной модификации белков, определенные в спонтанном режиме в области видимого и ультрафиолетового спектра,

не имели значимых различий между группой 2 и здоровыми лицами (*таблица 20*).

На 7-е сутки в подгруппе 2а на фоне только ингаляционного лечения зарегистрировано накопление как ранних (АДНФГ), так и поздних (КДНФГ) продуктов окислительной модификации белков, свидетельствующее о наличии окислительного клеточного стресса в зоне оперативного вмешательства. Примечательно, что поздние продукты динитрофенилгидразонов являются карбонильными дериватами белков и имеют необратимый характер.

Применение локальной озонотерапии в подгруппе 2б на 7-е сутки лечения привело к снижению содержания продуктов ОМБ в сравнении с показателями подгруппы 2а и отсутствию различий с показателями здоровых лиц, что отражает наличие ограничивающего окислительную модификацию белков эффекта озона.

На 10-е сутки на фоне озонотерапии показатели количества ранних и поздних продуктов ОМБ в подгруппе 2б фиксировались на уровне значений здоровых лиц.

Изучение содержания продуктов ОМБ в металл-катализируемом режиме позволяет оценить прирост образования под действием реактива Фентона карбонильных производных с подсчетом отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному. При сравнении показателей ОМБ, регистрируемых в индуцированном режиме в области видимого и ультрафиолетового спектра, значимых различий между показателями группы 2 и здоровыми лицами не зафиксировано (*таблица 21*).

**Таблица 21 – Показатели окислительной модификации белков в металл-катализируемом режиме в слизистом отделяемом голосовых складок в условиях озонотерапии, в у.е./мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР				
		Группа 2 До хирургического 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
S <sub>АДНФГ uv</sub>	261,1 (219,8; 354,1)	253,2 (211,2; 367,7)	455,3 (313,1; 686,8) <sup>*,**</sup>	340,6 (217,1; 372,1) <sup>#</sup>	383,6 (285,8; 415,9) <sup>*,**</sup>	249,6 (189,3; 262,7) <sup>#</sup>
S <sub>АДНФГ vs</sub>	37,4 (26,7; 48,6)	30,5 (22,2; 46,8)	71,8 (66,8; 90,3) <sup>*,**</sup>	39,5 (27,1; 47,7) <sup>#</sup>	62,5 (57,9; 81,2) <sup>*,**</sup>	33,5 (28,9; 60,1) <sup>#</sup>
S <sub>КДНФГ uv</sub>	50,7 (34,3; 68,4)	46,2 (31,5; 63,2)	80,2 (70,4; 92,6) <sup>*,**</sup>	47,8 (38,5; 63,6) <sup>#</sup>	71,2 (52,3; 91,3) <sup>*,**</sup>	44,5 (32,5; 60,1) <sup>#</sup>
S <sub>КДНФГ vs</sub>	1,9 (1,6; 2,9)	2,6 (1,2; 3,6)	8,2 (6,1; 10,8) <sup>*,**</sup>	4,4 (4,2; 6,0) <sup>*,#</sup>	6,8 (5,1; 7,6) <sup>*,**</sup>	3,1 (1,9; 4,2) <sup>#</sup>
S <sub>ОМБ инд.</sub>	328,1 (319,4; 387,7)	335,2 (313,3; 437,5)	688,5 (472,4; 786,2) <sup>*,**</sup>	379,0 (293,2; 437,1) <sup>#</sup>	456,3 (421,6; 612,3) <sup>*,**</sup>	325,6 (235,4; 375,6) <sup>#</sup>
S <sub>АДНФГ</sub>	282,5 (276,4; 311,7)	289,6 (286,6; 320,2)	525,7 (386,7; 697,1) <sup>*,**</sup>	323,7 (205,3; 421,4) <sup>#</sup>	386,3 (259,6; 412,3) <sup>*,**</sup>	268,9 (221,1; 298,6) <sup>#</sup>
S <sub>КДНФГ</sub>	42,8 (38,2; 69,7)	48,7 (31,2; 57,8)	88,2 (74,5; 109,5) <sup>*,**</sup>	52,7 (43,1; 69,6) <sup>#</sup>	76,3 (64,3; 84,5) <sup>*,**</sup>	47,6 (38,5; 53,6) <sup>#</sup>
S <sub>ДНФГ uv</sub>	311,8 (251,0; 429,3)	299,8 (241,0; 433,3)	534,5 (378,5; 776,3) <sup>*,**</sup>	374,1 (259,3; 432,2) <sup>#</sup>	456,9 (325,4; 612,3) <sup>*,**</sup>	269,7 (213,5; 321,5) <sup>#</sup>
S <sub>ДНФГ vs</sub>	38,5 (28,9; 51,1)	34,5 (23,8; 48,5)	78,3 (74,5; 102,2) <sup>*,**</sup>	41,3 (31,2; 53,4) <sup>#</sup>	67,5 (54,2; 89,3) <sup>*,**</sup>	39,7 (28,6; 45,3) <sup>#</sup>
РАП, % [Me (Q <sub>25</sub> ; Q <sub>75</sub> )]	90,8 (71,6; 114,1)	92,8 (81,5; 109,1)	71,6 (52,7; 84,3) <sup>*,**</sup>	88,5 (76,3; 99,7) <sup>#</sup>	84,2 (62,3; 91,7)	92,3 (65,3; 98,8)

*Примечание:* \* – значимые согласно критерию Манна – Уитни ( $p \leq 0,02$ ) различия с группой 1; \*\* – с группой 2; # – с подгруппой 2а; vs – видимый спектр; uv – ультрафиолетовый спектр; S – количество; ДНФГ – динитрофенилгидразоны; АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны; КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны; РАП – резервно-адаптационный потенциал.

В подгруппе 2а, получающей только ингаляционную терапию 0,9% раствором натрия хлорида, показатели суммарного содержания продуктов ОМБ в области видимого и ультрафиолетового спектра в металл-индуцированном режиме оказались значимо повышенными на 7-е сутки лечения в сравнении с показателями до хирургического лечения и значениями здоровых лиц и по своей направленности соответствовали изменениям показателей ОМБ в спонтанном режиме. Напротив, в подгруппе 2б, получающей дополнительно озонотерапию, на 7-е и 10-е сутки зафиксировано значимое снижение в сравнении с подгруппой 2а содержания ранних продуктов ОМБ – АДНФГ, регистрируемых в области основного и нейтрального спектра и отвечающих за агрегационные изменения белковых молекул, и поздних продуктов ОМБ – КДНФГ, регистрируемых в указанном выше спектральном диапазоне и являющихся маркерами деструкции белковых молекул. Все определяемые показатели ОМБ в индуцированном режиме на 7-е и 10-е сутки озонотерапии, за исключением КДНФГ vs, не имели различий с показателями здоровых лиц.

При оценке общего резервно-адаптационного потенциала (РАП) в подгруппе 2а зафиксировано снижение показателя на правах тенденции, не достигающей уровня значимости ( $p \leq 0,02$ ), в сравнении с группами 1 и 2. В подгруппе 2б уровень РАП не имел различий с аналогичным показателем группы здоровых лиц.

Зафиксированное нами увеличение концентрации продуктов ПОЛ и ОМБ в послеоперационном периоде, если основываться на значениях подгруппы 2а, не получающей озонотерапии, может являться отражением оксидативного стресса, инициируемого продукцией АФК активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами. Эскалация оксидативного стресса, инициируемого продукцией АФК активированными клетками в раневой зоне в условиях дефицита активности и/или количества ферментов антиоксидательной защиты, приводит к вторичной альтерации, пролонгации воспалительного процесса и, как следствие, переходу в хронический

воспалительный процесс, препятствующий полному восстановлению фонаторной способности голосовых складок. В то же время известно, что компоненты окислительного стресса способны принимать непосредственное участие в редокс-сигнализации в клетке посредством инициации конформационных преобразований глутатиона [1, 23].

Применение озонотерапии локально в зоне альтерации приводит к взаимодействию озона с полиненасыщенными жирными кислотами клеточных мембран, что сопровождается усилением образования в клетке неклассических вторичных мессенджеров, в частности, 4-HNE (4-гидроксиноненаля), вторично запускающих адаптивный ответ через активацию в клетках ядерного редокс-чувствительного фактора транскрипции Nrf2, усиливающего экспрессию генов антиоксидантов, ферментов детоксикации, регуляторов апоптоза [54, 57], что, согласно нашим данным, приводит к ограничению окислительной деструкции липидов и белков в очаге воспаления, способствует сокращению времени и интенсивности альтеративно-экссудативных процессов. Более того, цитопротективное действие озона и его дериватов может быть также опосредовано способностью озонидов к модуляции митохондриального биогенеза и коррекции гипоксии [65, 145, 203]. Также доказано влияние озона на внутриклеточный эритроцитарный метаболизм, заключающееся в повышении в эритроцитах уровня 2,3-дифосфоглицерата, облегчающего отдачу кислорода в ткани, что способствует коррекции гипоксических нарушений.

Важнейшим свойством озона и продуктов его трансформации является способность активировать нуклеарные транскрипционные факторы, в частности, NF-κB, что приводит к активации экспрессии генов цитокинов различной функциональной направленности при иммунном ответе, в том числе оказывающих влияние на процессы репарации. Нами изучены концентрации ряда цитокинов регуляторной направленности и факторов роста, участвующих в процессах репарации тканей: IL-2, GM-CSF, IL-4, VEGF, TGF-β (таблица 22).

**Таблица 22 – Содержание цитокинов регуляторной направленности в слизистом отделяемом в динамике раневого процесса в условиях озонотерапии, в пг/мг белка [Me (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>)]**

Показатель	Группа 1 Здоровые лица n = 20	ЭППР				
		Группа 2 До хирургического 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
IL-4	5,4 (2,7; 6,3)	6,6 (4,1; 7,3)	3,0 (1,9; 4,0) *,**	6,8 (4,2; 8,8) **, #	3,7 (2,7; 4,2) *,**	6,9 (4,7; 7,6) #
IL-2	2,3 (1,2; 3,3)	3,4 (1,5; 4,3)	3,2 (2,1; 3,7)	4,1 (2,2; 4,6)	3,4 (3,1; 4,2)	3,9 (3,4; 4,4)
GM-CSF	9,3 (7,1; 11,3)	11,3 (10,1; 15,3)	13,5 (9,6; 15,2) *,**	28,2 (17,3; 32,6) *,**, #	19,4 (15,3; 22,3) *,**	30,1 (24,3; 34,6) *,**, #
VEGF	13,7 (9,8; 15,3)	19,6 (16,2; 22,3)	24,4 (20,3; 28,1)	35,6 (29,8; 48,2) *,**, #	26,3 (23,1; 30,1) *,**	37,2 (34,2; 49,3) *,**, #
TGF-β	46,1 (38,2; 54,3)	37,6 (26,3; 44,2)	55,4 (39,3; 64,1)	70,5 (65,7; 84,3) *,**, #	59,6 (47,5; 64,8) *,**	67,2 (64,5; 78,3) *,**, #

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

Как видно из таблицы 22, на фоне озонотерапии на 7-е и 10-е сутки отмечено значимое повышение уровней индукторов репаративных процессов: IL-4, GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста), VEGF, TGF- $\beta$  в сравнении с группой 1, группой 2 и подгруппой 2а.

В научной литературе имеются сведения о сокращении сроков репарации после обработки раневой поверхности озонированным растительным маслом за счет увеличения миграции фибробластов, реализуемой через сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) / протеинкиназа B (Akt) / mTOR [92], увеличения степени аутофагии в ране и посредством активации AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK)/mTOR [91]. В свою очередь, фибробласты являются основными поставщиками медиаторов репарации в ткани: GM-CSF, проангиогенных факторов (VEGFs, FGFs, TGF- $\beta$ 1, HGF/SF и ангиопоэтина-1) – и TGF- $\beta$ , играющего ключевую роль в регуляции эпидермального морфогенеза. Продуцируя коллаген IV, VII типов, ламинин и энтактин/нидоген, фибробласты влияют на формирование базальной мембраны [2, 33, 34].

### Резюме

Применение локальной озонотерапии в комплексном послеоперационном лечении пациентов с полипами голосовых складок приводит к снижению уровня продуктов окислительной модификации липидов и белков за счет мультимодальных эффектов озона, что способствует ограничению зоны вторичной альтерации, а следовательно, уменьшению выраженности воспалительных изменений, активации репаративных процессов в ране и доказывает целесообразность применения топической озонотерапии в послеоперационном лечении экссудативных доброкачественных опухолеподобных образований пространства Рейнке.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3

### Список публикаций по материалам, изложенным в разделе 3.1 главы 3

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

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

4. **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 Уральского медицинской академической науки. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 379–385 (ИФ РИНЦ – 0,433, K2).

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

6. **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).

### Список публикаций по материалам, изложенным в разделе 3.2 главы 3

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

1. 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, К3).

2. 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, К3).

3. **Ковалев, М.А.** Влияние локальной озонотерапии на показатели окислительной модификации липидов и белков после лазерного удаления полипов голосовых складок / **М.А. Ковалев**, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка. – [Текст: электр.] // Современные проблемы науки и образования. – 2023. – № 2. – URL: <https://science-education.ru/article/view?id=32584> (ИФ РИНЦ – 0,528, К1).

*Публикации в других изданиях*

4. **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 Подмосковья: материалы юбилейной научно-практической конференции. – Одинцово, 2022. – С. 323–329.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экссудативные поражения пространства Рейнке (ЭППР) представляют собой одну из разновидностей доброкачественной продуктивной патологии гортани, имеют не только медицинское, но и важное социальное значение в силу широкой распространенности среди профессионалов голоса: актеров, певцов, комментаторов, преподавателей, дикторов [9, 40, 59, 181].

Основная роль в развитии ЭППР принадлежит хронической профессиональной фонотравме, чаще на фоне воздействия на ткани гортани агрессивных ирритантов, включая аллоантигены, токсичные компоненты табачного дыма, кислого содержимого желудка при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) и природных поллютантов [21, 41, 51]. Особенности морфоархитектоники голосовых складок, заключающиеся в выраженной субэпителиальной васкуляризации с большим количеством расширенных, обладающих повышенной проницаемостью капилляров на фоне недостаточности отведения тканевой жидкости по слаборазвитой сети лимфоколлекторов, способствуют развитию отека тканей пространства Рейнке при формировании ЭППР. Лимфодренаж гортани сложен в силу определенных особенностей оттока лимфы, связанных с необходимостью огибать более плотные ткани голосовых складок, голосовой мышцы, пластинки щитовидного хряща, обогнув которые, лимфа поступает в более крупные лимфатические сосуды под- и надскладочного отделов слизистой оболочки гортани. Механическая перманентная фонотравма дополнительно травмирует ткани и приводит к возникновению микрокровоизлияний в голосовые складки уже на начальных стадиях заболевания.

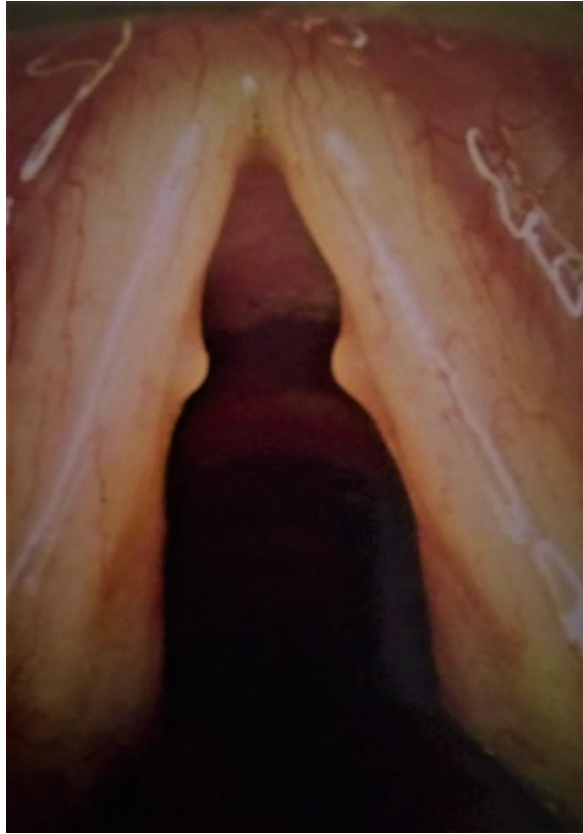
На ранних этапах формирования ЭППР к характерным патоморфологическим особенностям можно отнести наличие выраженного стромального отека, расширение и истончение сосудов микрокапиллярного типа с расстройством кровообращения в виде явлений стаза, тромбоза,

плазморрагий, отдельных зон пролиферации фибробластов. Подобная морфологическая картина характерна для ЭППР, условно обозначаемых «мягкими», 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.

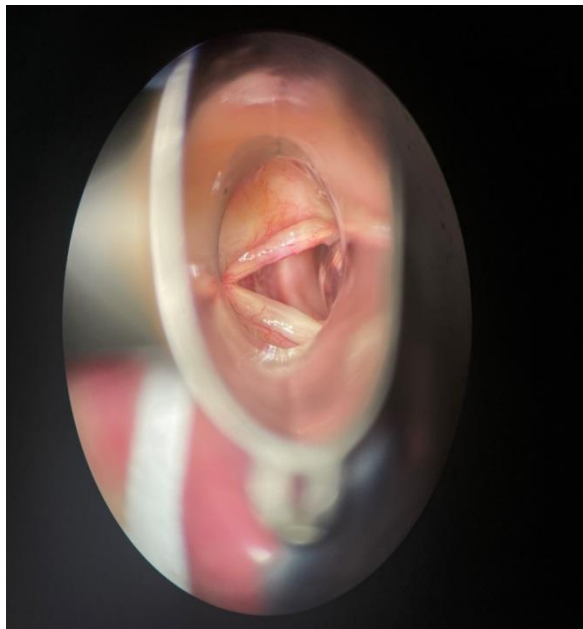
Морфометрический анализ тканей ЭППР, проводимый преимущественно в субэпителиальной зоне, включающей элементы мукозоассоциированной ткани региона гортани, также позволил установить ряд особенностей клеточного состава: количество нейтрофилов в тканях всех изучаемых форм ЭППР оказалось самым малочисленным 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, среди клеточных элементов зафиксировано преобладание фибробластов, являющихся основными клеточными элементами стромы органа и выполняющих функцию поддержания тканевого гомеостаза, в сравнении с тканями «мягких» новообразований. 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 строме, кроме массы кистозно измененных полостей, заполненных серозным или белковым транссудатом, зафиксировано большое представительство лимфоцитов и гистиоцитов, активно участвующих в реакциях иммунного реагирования.

Учитывая морфологические и морфометрические особенности различных форм ЭППР, представляется возможным предположить эволюцию новообразований в зависимости от длительности течения заболевания: к ранним формам можно отнести «мягкие» новообразования (миксоидные полипы и отек Рейнке, с дебютом заболевания в среднем менее одного года согласно анамнестическим данным), а к поздним формам – «плотные» новообразования (полипы ангиоматозного типа, голосовые узелки, ткани которых подвергались морфофункциональным изменениям в среднем более одного года). Важным уточнением является тот факт, что все отделы голосовых складок выстланы многорядным цилиндрическим эпителием, за исключением медиальных краев голосовых складок, которые выстланы многослойным плоским эпителием, более приспособленным к механическому трению при фонации, и именно на медиальных краях формируются голосовые узелки. При хроническом перенапряжении в результате трения голосовых складок друг о друга образуется гиперкератозный слой эпителия с прослойкой подлежащей фиброзной ткани. Ряд авторов также описывает [3, 41, 42] стадийность формирования голосовых узелков от более «мягких» на ранних этапах с признаками расширения тонкостенных капилляров подслизистого слоя, отеком, признаками микрокровоизлияний с появлением широкого основания (*рисунок 16*). 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 17*).



**Рисунок 16 – Голосовые узелки (начало формирования), симметричные**

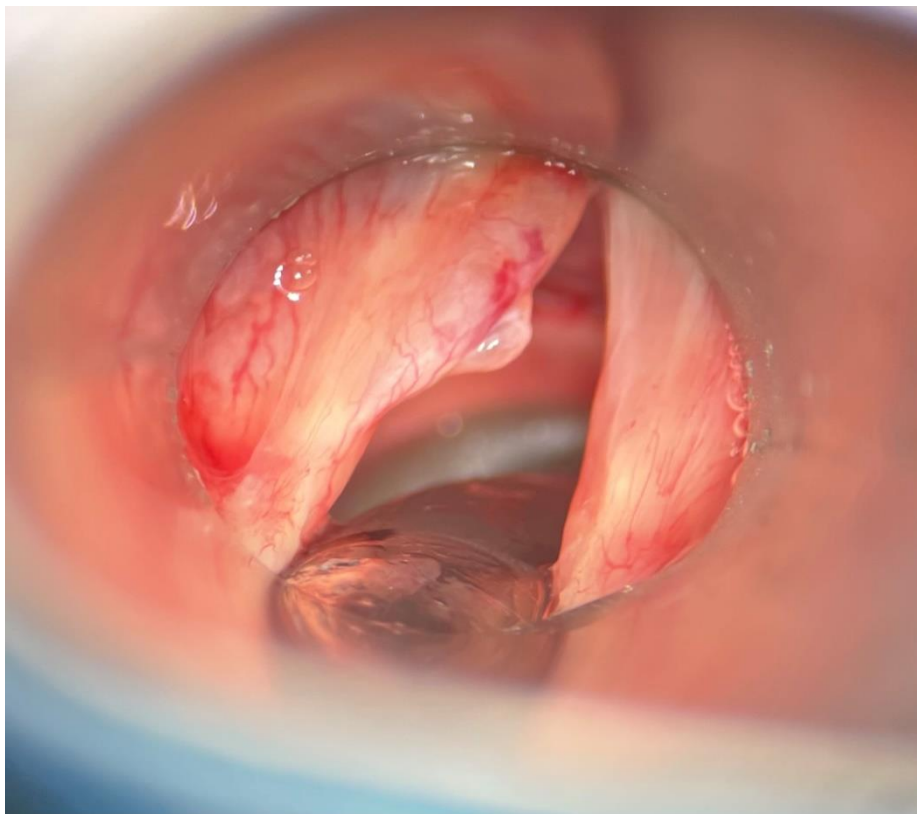
*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ . Пациент С., 32 года. Профессия – актер. Срок давности заболевания – 6 месяцев.



**Рисунок 17 – Голосовые узелки («плотные»)**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ . Пациент К., 36 лет. Профессия – вокал. Срок давности заболевания – 2,5 года. До оперативного лечения.

Формирование полипов голосовых складок нередко начинается с внезапной чрезмерной голосовой нагрузки, например, твердой атаки голоса, заключающейся в плотном смыкании голосовых складок до начала звука, в результате которой на желудочковой части голосовых складок возникает, как правило, одностороннее подслизистое кровоизлияние с последующей организацией в припухлость, состоящую из соединительнотканного компонента и кровяного сгустка. Позже кровяной сгусток рассасывается, и полость заполняется тканевой жидкостью. Так формируется полип миксоидного типа; он может иметь тонкую ножку или широкое основание (*рисунки 18, 19*). При прогрессировании заболевания «мягкий» полип в результате морфофункциональных ремоделирующих перестроек трансформируется в «плотный» полип ангиоматозного типа (*рисунок 20*).



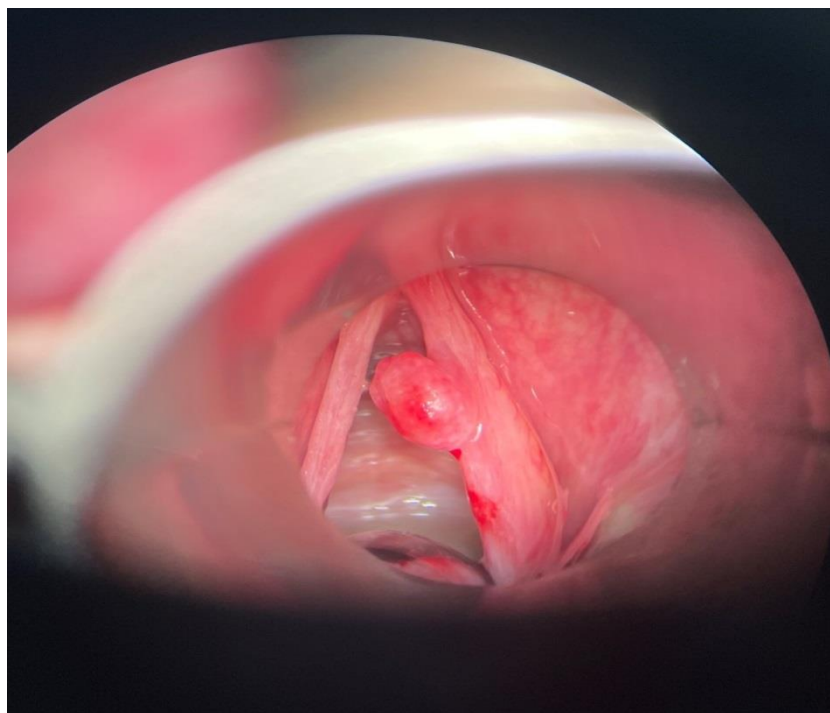
**Рисунок 18 – Полип миксоидного типа с кровоизлиянием («мягкий») левой голосовой складки**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув. ×2. Пациентка И., 42 года. Профессия – преподаватель. Дебют заболевания – 10 месяцев.



**Рисунок 19 – Полип миксоидного типа («мягкий») левой голосовой складки**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ . Пациентка Ю., 24 года. Профессия – учитель начальных классов. Дебют заболевания – 5 месяцев.

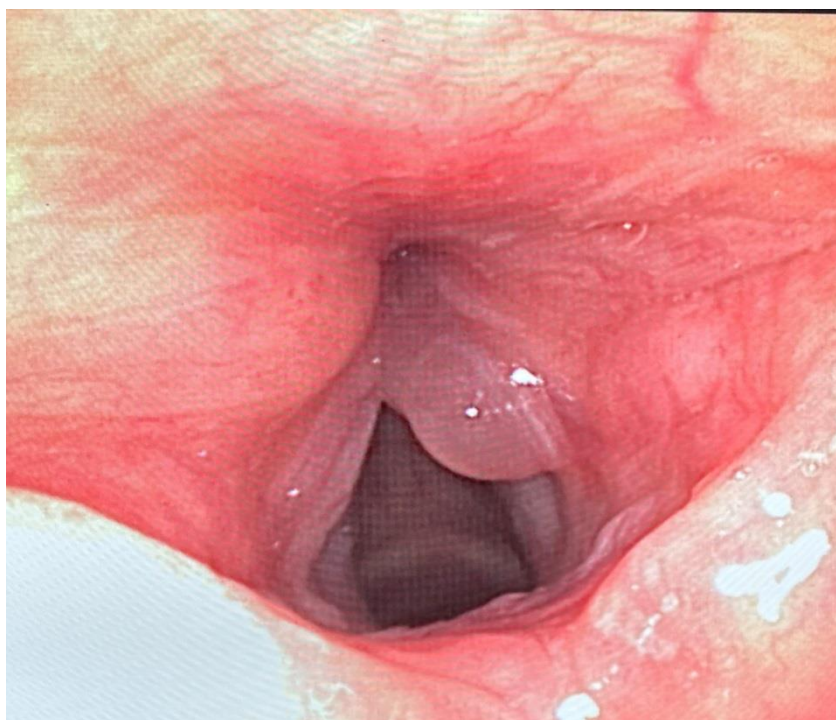


**Рисунок 20 – Полип «плотный» ангиоматозного типа, на ножке**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ . Пациент Н., 37 лет. Профессия – спортивный тренер. Срок давности заболевания – 1,5 года.



Основным этиологическим фактором формирования отека Рейнке является хроническая никотиновая интоксикация [8, 14, 178]. Характерный симптом заболевания – постепенное снижение высоты голоса и его огрубение («голос курильщика»). Табачный дым негативно воздействует на всю поверхность голосовой складки неизбирательно, поэтому отек формируется на широком основании мембранозной части голосовой складки, практически всегда двусторонне и бывает настолько выраженным, что может приводить к обструкции дыхательных путей (*рисунок 21*).



**Рисунок 21 – Отек Рейнке**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув.  $\times 2$ . Пациентка Г., 34 года. Профессия – юрист. Стаж курения – 6 лет. Срок давности заболевания – менее 1 года.

Согласно концепции единства, дискретно расположенных анатомических отделов МАЛТ, регион гортани содержит гортань-ассоциированную лимфоидную ткань – LALT (Larynx-Associated Lymphoid Tissue) [205], обладающую относительной автономией по отношению к системным проявлениям иммунных процессов.

Несмотря на то, что ведущим компонентом патогенеза всех экссудативных поражений голосовых складок являются расстройства



микроциркуляции в пространстве Рейнке с развитием капиллярно-лимфостаза и интерстициального отека, а специфичность поражений обусловлена типичным расположением на голосовых складках, по результатам иммуногистохимического исследования нами выделены четыре иммунофенотипа ЭППР:

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

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

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

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

В ряде научных публикаций имеются данные о содержании в зоне МАЛТ гортани основных субпопуляций лимфоцитов: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов – с экспрессией антигенов HLA класса II, макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток, гранулоцитов, эозинофилов, организованных в структурированные клеточные скопления [69, 188, 204, 205]. Наиболее высокое представительство дендритных клеток, NK-, Т- и В-клеток описано в подгортанных тканях (субглоттисе), наиболее низкое – в области истинных голосовых складок [205]. Примечательно, что в тканях голосовых складок плода человека дендритные клетки, Т-, В-лимфоциты и макрофаги полностью отсутствуют [177]. Субпопуляционный состав лимфоцитов МАЛТ гортани

наиболее полно представлен в собственной пластинке по сравнению с эпителием, при этом В-лимфоциты практически отсутствуют в эпителиальном слое [205].

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-макрофагальной линии  $CD68^+$  и клеток с экспрессией  $MMP-9^+$ , 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 [21]. Лимфоидные клетки из указанных областей гортани мигрируют преимущественно в глубокую шейную цепь лимфатических узлов [21]. В тканях «плотных» новообразований зафиксированы значительные нарушения микроциркуляции за счет гипоксически-ишемических и далее дистрофических изменений с развитием фиброза, избыточной васкуляризацией стромы, ремоделированием соединительнотканного матрикса, на что указывает высокое содержание  $MMP-9$  в тканях голосовых узелков и ангиоматозном типе полипов, одной из функций которой является деструкция коллагеновых структур, являющихся основой базальных мембран эпителия и эндотелия микрососудов. Можно предположить, что при данных гистологических разновидностях высокая активность  $MMP-9$  является одним из ведущих факторов, регулирующих проницаемость базальных мембран для жидкостных и форменных элементов крови, лимфы и перемещения тканевой жидкости [12]. В то же время способность цинк-зависимых эндопептидаз, в частности  $MMP-1$ ,  $-9$ , разрушать все типы белков внеклеточного матрикса приводит, с одной стороны, к повышению проницаемости тканей патологически измененной области голосовых складок, с другой – способствует инициации реакций иммунного реагирования на фрагменты деградации белков, хемотаксису и активации

клеток моноцитарно-макрофагальной линии (CD68<sup>+</sup>), синтезу хемокинов и цитокинов различной функциональной направленности [12].

Поддержание клеточного гомеостаза МАЛТ гортани зависит от согласованной работы ингибиторов и индукторов апоптоза и может изменяться в зависимости от характера патологического процесса. Белки семейства bcl-2 экспрессируются преимущественно в зонах патологически измененных тканей, содержащих пролиферирующие клетки, его задачей является пролонгация жизни клеточной популяции, в том числе пролиферирующих и дифференцирующихся клеток эпителия, иммунных клеток. bcl-2 способствует выживанию клеток путем связывания с фактором ингибирования апоптоза APAF1 и/или ингибирует каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий, тем самым блокируя альтернативный путь реализации апоптоза. 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 на фоне 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.

Все вышеизложенное указывает на особую значимость мукозального иммунитета региона гортани при формировании различных клинικο-морфологических вариантов экссудативных поражений пространства Рейнке, связанных рядом единых аспектов патогенеза.

Особенности иммунного и тканевого фенотипа МАЛТ предполагают различия и в составе биологически активных секреторных компонентов МАЛТ. Исследование цитокинового профиля (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\beta$ , Fractalkine, I-TAC, GM-CSF, TGF- $\beta$ , VEGF) тканей различных форм ЭППР

показало, что ткани «плотных» полипов содержат значимо более высокие концентрации функционально связанных между собой IL-17A 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-17, IL-21, IL-22, GM-CSF, участвующих в реализации противомикробного барьерного иммунитета, процессах регуляции дифференцировки дифферона фибробластов [37, 52]. 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 Т-клеточного альфа хемоаттрактанта (I-TAC; семейство CXCL11), принимающих активное участие в активации, миграции и хемотаксисе иммунных клеток [20]. Активатором и основным регулятором продукции I-TAC является IFN- $\gamma$ ; I-TAC 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 наиболее 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, NIF-1 $\alpha$ , протеазы (MMP-2, -9), структурных белков (фибронектина, декорина), способных менять сигнализацию и активировать факторы врожденного иммунитета, например, дендритные клетки, макрофаги, НК-клетки [33, 34, 46]. Имеются данные

о способности фибробластов модулировать раннюю экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-8, I-TAC, MCP-1) и позднюю экспрессию факторов роста (TGF- $\beta$ ) и участвовать 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 «мягких» полипов (миксоидный тип) и отека Рейнке нами зафиксировано повышение концентрации СС-хемокинов – MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\beta$ ), CX<sub>3</sub>C-хемокинов и фракталкина (CX<sub>3</sub>CL1), 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 СС-хемокинам на клетках может избирательно меняться в зависимости от степени дифференцировки клетки [97]. Макрофагальные воспалительные белки – MIP (1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\beta$ ), экспрессируясь в основном на активированных моноцитах/макрофагах, фибробластах, клетках эпителия, гладкомышечных клетках сосудов, имеют способность связываться с внеклеточными протеогликанами (декорином, синдеканом, агреканом), являющимися компонентами внеклеточного матрикса, и выполняют ряд важнейших функций: играют роль фильтров, ограничивающих проникновение вирусов и бактерий в ткани; активно поглощают трансудат, способствуя защите тканей голосовых складок от повышенного гидростатического давления; связывают, в качестве корцепторов, факторы роста (эпителиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста  $\beta$ , фактор роста эндотелия), тем самым способствуя их концентрации и стабилизации. Фракталкин (CX<sub>3</sub>C-хемокин) повышает селективную опосредованную адгезию клеток врожденного (моноцитов, NK-клеток) и адаптивного (Т-лимфоцитов) иммунитета [13].

Наличие хронического воспалительного процесса в тканях ЭППР предполагает усиление секреции цитокинов различной регуляторной направленности. Нами установлено значимое повышение концентрации IL-10 в тканях «мягких» новообразований, обладающего мощным 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 [32]. 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 процессов неоангиогенеза посредством IL-10 зависимого ингибирования продукции проангиогенных факторов роста (VEGF) и стимуляции продукции MMP-9 играет важнейшую роль в процессах 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 содержания GM-CSF может быть оправдано с точки зрения пополнения популяции данной клеточной линии и повышения выживаемости клеток в условиях гипоксии.

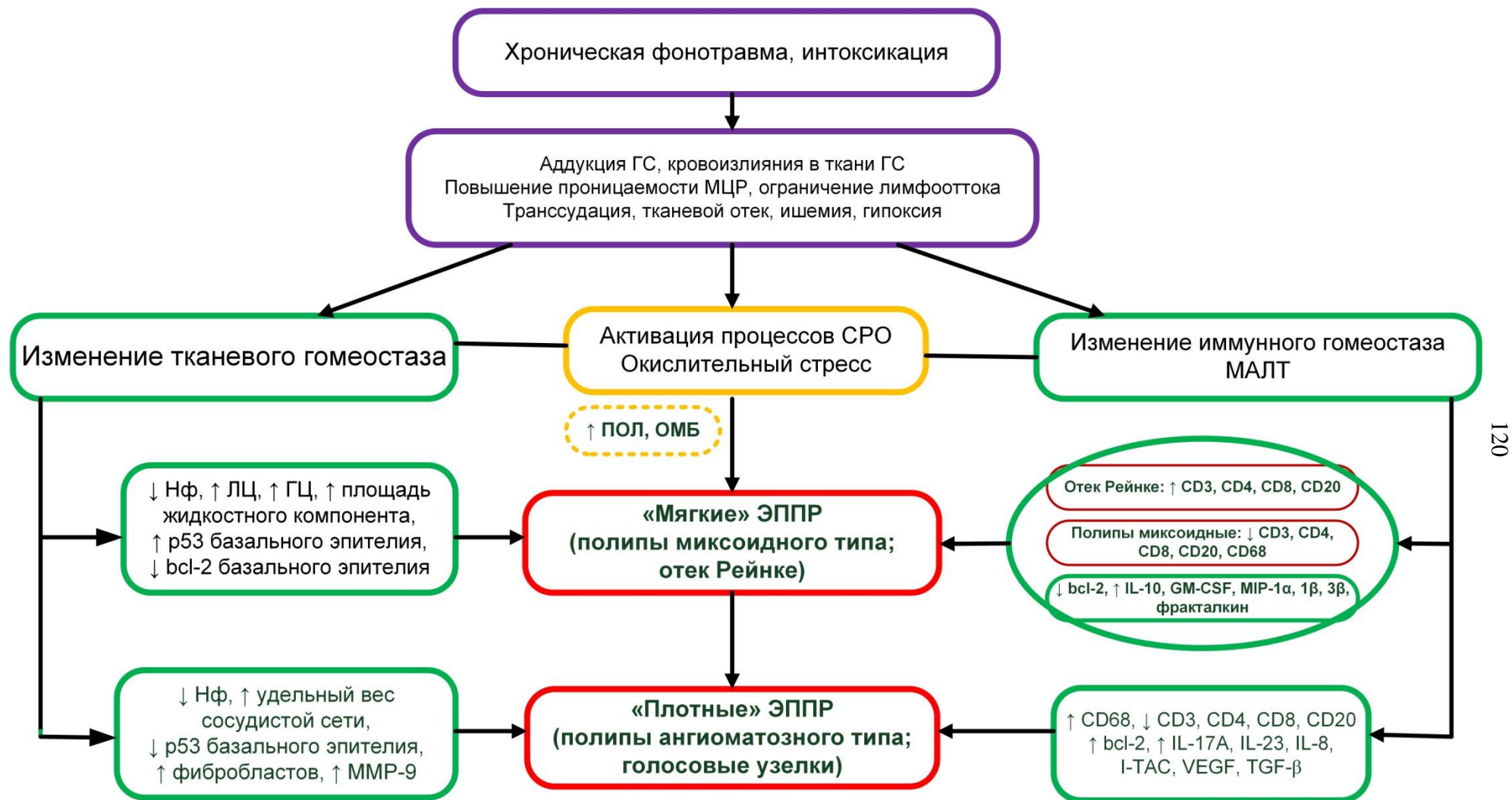
Напротив, в тканях «плотных» новообразований, где наиболее активно происходят процессы ремоделирования тканей, неоангиогенез, установлено повышение концентрации фактора роста эндотелия (VEGF) и трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Секреторную активность фибробластов в отношении экспрессии VEGF, TGF- $\beta$ , иных компонентов внеклеточного матрикса, матриксных металлопротеиназ увеличивает повышенный уровень гипоксией индуцированного фактора 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [22]. TGF- $\beta$  выполняет роль супрессора продукции провоспалительных цитокинов, модулятора генов, вовлеченных в ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса, метаболизм протеинов, сигнальную систему клетки и пролиферацию [2, 126]. TGF- $\beta$  может выступать полифункциональным

модулятором клеточного роста и обновления путем ингибиции клеточного цикла в фазе G1 и способности к индукции апоптоза путем трансформации Foxp3+ Treg-лимфоцитов из наивных клеток-предшественников [126].

Ишемически-гипоксические изменения в тканях голосовых складок не только индуцируют активацию иммунокомпетентных клеток МАЛТ, но и способствуют развитию оксидативного клеточного стресса путем генерации АФК и продуктов 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, усиливающего гипоксически-ишемические изменения, способствующие развитию окислительного клеточного стресса и поддержанию хронического воспаления.

Таким образом, МАЛТ региона гортани и голосовых складок активно участвует в реакциях иммунного реагирования, имеет особенности иммунофенотипа при разных формах ЭППР. Полученные нами данные напрямую указывают на важнейшее значение МАЛТ в поддержании тканевого и иммунного гомеостаза тканей, непосредственное участие в формировании патологии и процессах ремоделирования тканей. При развитии хронического воспалительного процесса в тканях голосовых складок важнейшую роль в процессах вторичной альтерации и сигналинга играют также продукты СРО.

Роль изменений тканевого и иммунного гомеостаза голосовых складок, процессов свободнорадикального окисления в патогенезе различных форм ЭППР представлена на интегральной схеме (рисунок 22).



**Рисунок 22 – Роль изменений тканевого и иммунного гомеостаза голосовых складок, процессов свободнорадикального окисления в патогенезе различных форм ЭППР**



Формирование ЭППР клинически и эндоскопически не сопровождается развитием острого воспаления в тканях голосовых складок, однако морфологически определяются признаки хронических воспалительных изменений в зоне патологии, на что указывает и повышение в тканях концентрации некоторых цитокинов и хемокинов, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ). Консервативная стратегия лечения ЭППР даже в варианте «мягких» новообразований, как правило, не приводит к стойкому клинически приемлемому эффекту, в последующем они требуют оперативного лечения.

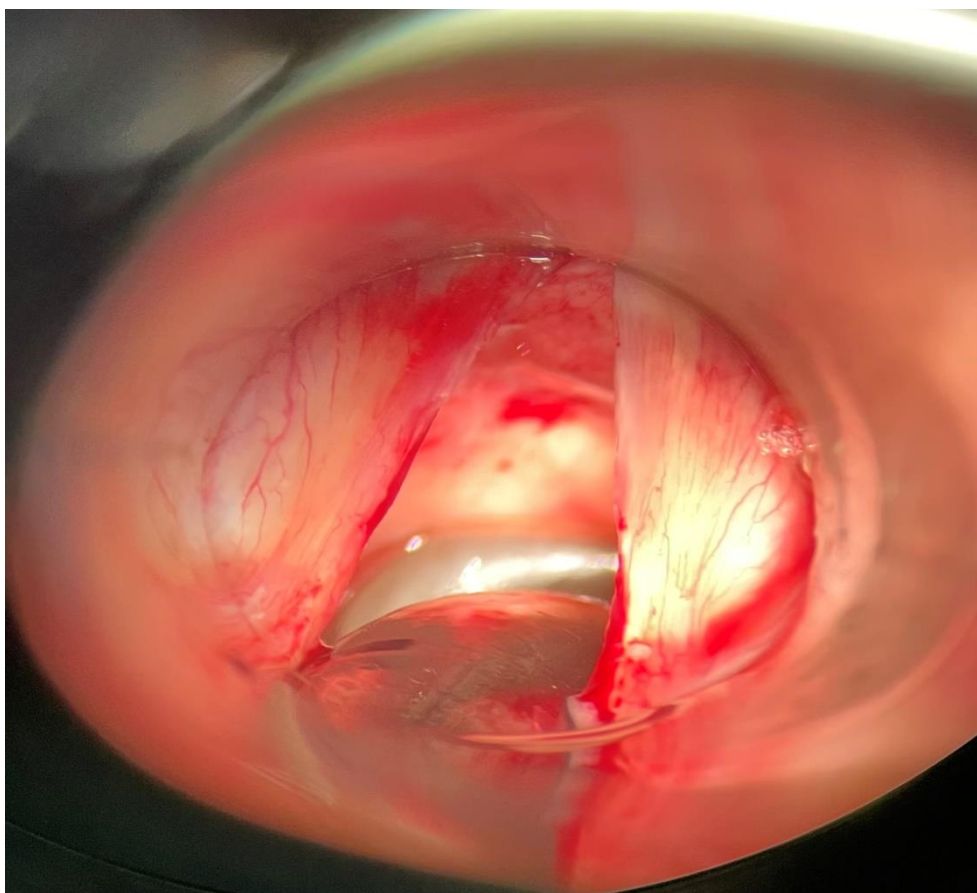
Оперативное удаление новообразований приводит к дополнительной травматизации тканей и развитию реактивного воспалительного процесса в зоне операции. Именно поэтому в раннем послеоперационном периоде важно назначение восстановительной терапии, включающей голосовой покой, очищение, увлажнение, стимуляцию репаративных процессов для качественного восстановления фонаторной способности голосовых складок. Для этой цели используются различные виды ингаляционной терапии, физиотерапевтическое лечение. Одним из перспективных малоинвазивных методов послеоперационной противовоспалительной терапии является применение локальной озонотерапии.

Озон – плеiotропный регулятор гомеостаза, способный активировать синтез ферментов антиокислительной защиты, белков теплового шока, про- и противовоспалительных цитокинов, что выражается в способности регулировать редокс-статус; проявляет выраженный иммуностропный, противовоспалительный и репаративный эффекты.

Озонотерапия эффективно применяется в лечении лор-заболеваний, хирургической патологии опорно-двигательного аппарата, органов пищеварительной системы, в гнойной хирургии, комбустиологии, в акушерско-гинекологической практике, дерматокосметологии, при лечении острых и хронических вирусных гепатитов, язвенной болезни желудка

и двенадцатиперстной кишки [4, 70, 98, 129, 132, 133, 140, 144, 163, 174, 199, 215, 223].

После удаления новообразований голосовых складок в первые сутки наблюдался реактивный воспалительный процесс в зоне оперативного вмешательства, характеризующийся гиперемией, отеком голосовых складок, наличием фибриновых налетов, выраженной сосудистой реакцией, изменением конфигурации краев голосовых складок при фонации, болевыми ощущениями разной интенсивности, с максимальной выраженностью клинических проявлений на 2–3-и сутки (*рисунок 23*).



**Рисунок 23 – Состояние голосовых складок после оперативного вмешательства, 2-е сутки после операции**

*Примечание:* Эндоларингоскопия, ув. ×2

Применение озонотерапии в виде аппликаций озонированного растительного масла 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:

- **на 7-е сутки** значительно уменьшились проявления боли, гиперемии, отека, инфильтрации тканей, степень охриплости голоса; увеличилось 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, I-TAC 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; сохранялись 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. [54, 62, 63, 86, 151]. Озон и продукты озонлиза подавляют активность NF- $\kappa$ B и продукцию провоспалительных цитокинов (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23) [54, 57, 215]. Снижение синтеза хемокинов IL-8, I-TAC 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 [38, 135];

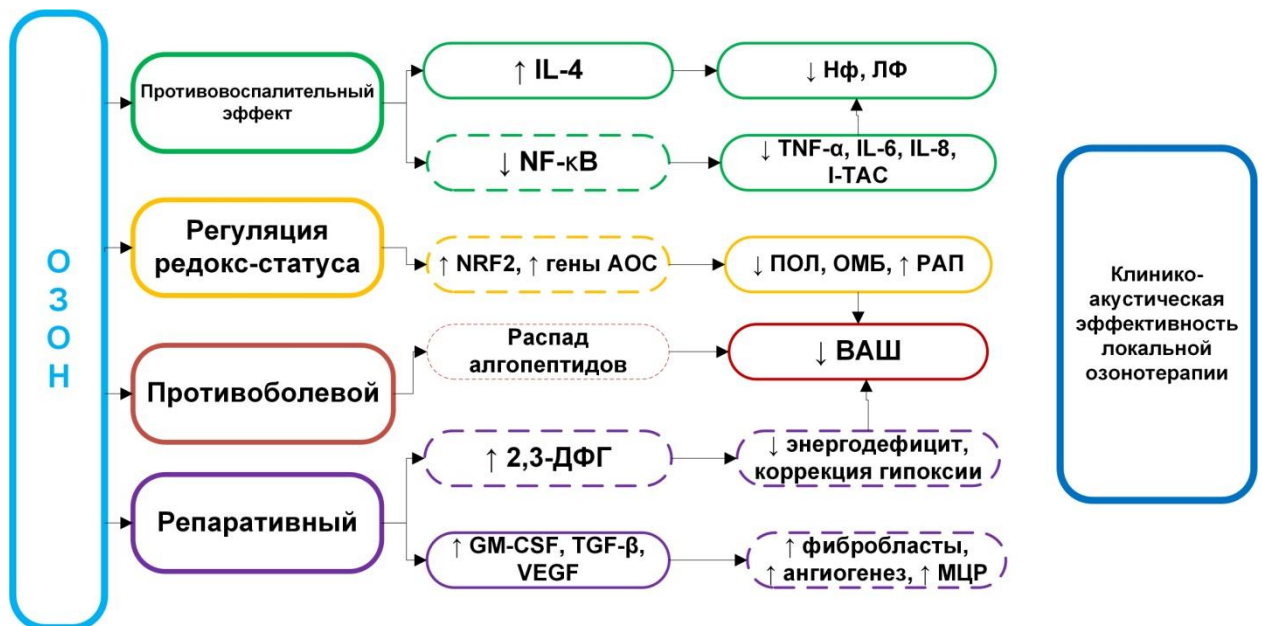
- *противоболевого*, обусловленного окислительной модификацией медиаторов воспаления, продуктов распада белковых молекул (алгопептидов), участвующих в передаче ноцицептивного сигнала в ЦНС, снижением продукции провоспалительных цитокинов, АФК;

- *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, усиливающего экспрессию генов антиоксидантов, ферментов детоксикации, регуляторов апоптоза, что приводит к ограничению окислительной деструкции липидов и белков. Пероксиды озона инициируют передачу сигнала через комплекс Keap1/Nrf2 с последующей модификацией белка KEAP и транслокацией Nrf2 в ядро [222]. Nrf2 взаимодействует в ядре с ARE (antioxidant response elements) и активирует синтез хиноноксидоредуктазы-1 (NQO1), гемоксигеназы-1 (HO-1), СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, гемоксигеназы и др. [1, 38, 215], тем самым повышая антиоксидантный потенциал клетки. Ограничение под влиянием озона окислительной деструкции липидов и белков способствует коррекции гипоксии и микроциркуляторных нарушений, ликвидации энергодифицита, 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 [54, 57]. Снижение уровня TNF- $\alpha$ , являющегося ингибитором выработки эритропоэтина, приводит к восстановлению регуляции эритропоэза. Под действием озона мембрана эритроцита становится более эластичной и деформируемой, что улучшает гемореологию [57];

- *репаративного* – за счет увеличения миграции фибробластов в зону воспаления, реализуемой через сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR [165]. 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 неангиогенезе посредством продукции проангиогенных факторов: VEGFs, FGFs, TGF- $\beta$ 1, HGF/SF и ангиопоэтина-1, индуцирующих дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток.

Ключевые механизмы протекторного действия озона, применяемого локально в раннем послеоперационном периоде оперативного лечения ЭППР, представлены на интегральной схеме (рисунок 24).



**Рисунок 24 – Механизмы протекторного действия озона в раннем послеоперационном периоде хирургического лечения ЭППР**

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

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.

## 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>; bcl-2<sup>+</sup> лимфоцитов; миксоидный тип полипов – низкое содержание CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, bcl-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>, bcl-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>; bcl-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 рекомендуется 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 СОКРАЩЕНИЙ**

- АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны  
АПК – антигенпрезентирующие клетки  
АФК – активные формы кислорода  
ВМФ – время максимальной фонации  
ГЭРБ – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь  
ДК – диеновые конъюгаты  
ДНФГ – динитрофенилгидразоны  
КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены  
КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны  
МАЛТ – мукозоассоциированная лимфоидная ткань  
ММР – матриксные металлопротеиназы  
ОМБ – окислительная модификация белков  
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
РАП – резервно-адаптационный потенциал  
СРО – свободнорадикальное окисление  
ШО – основания Шиффа  
ЭППР – эксудативные поражения пространства Рейнке

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Биохимия. – 2006. – Т. 1, № 9. – С. 1183–1198.
2. Аптекарь, И.А. Изменение функциональной активности фибробластов в процессе моделирования компрессии, гиперкапнии и гипоксии / И.А. Аптекарь, Е.Г. Костоломова, Ю.Г. Суховой // Российский остеопатический журнал. – 2019. – № 1-2. – С. 72–84.
3. Василенко, Ю.С. Голос. Фониатрические аспекты / Ю.С. Василенко. – Москва : Энергоиздат, 2002. – 480 с. – ISBN 5-283-02570-5.
4. Влияние ректального применения озона на интенсивность свободнорадикальной деструкции липидов и белков кишечника в динамике экспериментального колита / М.В. Осиков, Е.В. Давыдова, Н.В. Кайгородцева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 1. – С. 33–37.
5. Волчегорский, И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, В.Г. Яровинский // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127–131.
6. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Москва : Практика, 1999. – 459 с. – ISBN 5-89816-009-4.
7. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона / Е.Е. Дубинина // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 3. – С. 413–421.
8. Клинико-морфологические параллели при полиповидных образованиях голосовых складок / В.П. Быкова, Д.В. Калинин, О.О. Орехов, Э.А. Кочесокова

// 50-летие Городской клинической больницы № 67 : сб. науч. тр. – Москва, 2009. – С. 54–55.

9. Клиническая патология гортани : руководство - атлас / Н.А. Дайхес, В.П. Быкова, АБ. Пономарев, Х.Ш. Давудов. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2009. – 160 с. – ISBN 978-5-8948-1755-2.

10. Колесникова, Л.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога / Л.И. Колесникова, М.А. Даренская, С.И. Колесников // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – № 4. – С. 16–29.

11. Коркмазов, М.Ю. Клинико-иммунологическая оценка эффективности терапии хронического аденоидита у детей с использованием модифицированных форм кислорода / М.Ю. Коркмазов, О.А. Гизингер, С.А. Щетинин // Наука и практика в оториноларингологии: материалы XIV Российского конгресса оториноларингологов (10-11 нояб. 2015 г., г. Москва). – Москва, 2015. – С. 199–202.

12. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) / Л.Н. Рогова, Н.В. Шестернина, Т.В. Замечник, И.А. Фастова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 2. – С. 86–89.

13. Меснянкина, О.А. Фракталкин: патогенетическая роль и диагностические возможности / О.А. Меснянкина, Е.Ю. Янчевская, М. Бен // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – № 1 (2). – С. 148–151.

14. Морфология полипов и слизистой оболочки голосовых складок при болезни Рейнке / В.П. Быкова, Э.А. Кочесокова, Г.Ф. Иванченко, И.Д. Ротова // Архив патологии. – 2015. – Т. 77, № 1. – С. 30–37.

15. Мохотаева, М.В. Применение объективных и субъективных методов оценки качества голоса в фонопедической практике / М.В. Мохотаева, Л.В. Лопатина // VIII Петербургский международный форум оториноларингологов России (23-25 апр. 2019 г., г. Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург, 2019. – С. 303–304.

16. Острые и хронические ларингиты у профессионалов голоса / Ю.Е. Степанова, О.И. Коноплев, Т.В. Готовяхина [и др.] // Вестник оториноларингологии. – 2019. – № 1. – С. 68–71.

17. Патент № 2691370 Российская Федерация. Способ оценки состояния гортани при фонации у вокалистов : № 2018132333 : заявл. 10.09.2018 : опубл. 11.06.2019 / Готовяхина Т.В., Степанова Ю.Е., Мохотаева М.В., Махоткина Н.Н.; Опубл. 11.06.2019. – Москва, 2019.

18. Пискарев, М.И. Роль озона при химических процессах в плазме электрического разряда / М.И. Пискарев // Химия высоких энергий. – 2020. – Т. 54, № 3. – С. 223–227.

19. Поиск тканей-мишеней в орбите для аутоиммунной агрессии тиреоидных антител при эндокринной офтальмопатии / В.Г. Лихванцева, М.С. Афанасьев, Е.А. Руденко [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 557–566.

20. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов / М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. – № 5. – С. 529–536.

21. Романенко, С.Г. Острый и хронический ларингит / С.Г. Романенко // Оториноларингология : нац. рук. / под ред. В. Т. Пальчуна. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 541–547.

22. Светозарский, Н.Л. Фактор роста эндотелия сосудов: биологические свойства и практическое значение (обзор литературы) / Н.Л. Светозарский, А.А. Артифексова, С.Н. Светозарский. - Текст электронный // Медицина и образование в Сибири. – 2015. – № 5. – URL: <https://mos.ngmu.ru/article/pdf.php?id=1897> (дата обращения: 10.02.2023).

23. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма / М.А. Луцкий, Т.В. Куксова, М.А. Смелянец, Ю.П. Лушникова // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 12. – С. 24–28.

24. Состояние системы липопероксидации крови крыс при длительном воздействии озона / А.Г. Соловьева, П.В. Перетягин, С.П. Перетягин, А.К. Мартусевич // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2017. – № 1. – С. 31–37.

25. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов / Е.И. Львовская, И.А. Волчегорский, С.Е. Шемяков, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1991. – Т. 37, № 4. – С. 92–93.

26. Степанова, Ю.Е. Акустические характеристики голоса у представителей голосоречевых профессий с функциональной дисфонией по гипотонусному типу / Ю.Е. Степанова, М.В. Мохотаева, А.А. Корнеенков // Российская оториноларингология. – 2021. – № 4. – С. 58–63.

27. Степанова, Ю.Е. Важность своевременной диагностики заболеваний гортани при первичном осмотре врачом-оториноларингологом / Ю.Е. Степанова, Т.В. Готовяхина, Н.Н. Махоткина // Медицинский совет. – 2018. – № 20. – С. 58–64.

28. Степанова, Ю.Е. Заболевания гортани у лиц голосоречевых профессий / Ю.Е. Степанова, С.А. Артюшкин, Т.В. Готовяхина. – Санкт-Петербург : Полифорум, 2018. – 84 с. – ISBN 978-5-905896-13-2.

29. Степанова, Ю.Е. Клинико-диагностический алгоритм работы врача-оториноларинголога с профессионалами голоса / Ю.Е. Степанова, Е.Е. Корень, Т.В. Готовяхина // Российская оториноларингология. – 2019. – № 1. – С. 116–123.

30. Степанова, Ю.Е. Современные методы диагностики заболеваний гортани / Ю.Е. Степанова // Доктор.Ру. – 2009. – № 5. – С. 31–34.

31. Технологии озонотерапии в профилактике и лечении акушерской патологии / Е.Г. Сюдюкова, Б.И. Медведев, С.Л. Сашенков [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2020. – Т. 20, № 5. – С. 33–37.

32. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка,

В.А. Зурочка, М.А. Добрынина [и др.]. - Текст электронный // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2016. – № 2. – URL: [http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Annotations/a\\_ZAV-2016-2.pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Annotations/a_ZAV-2016-2.pdf) (дата обращения: 03.03.2023).

33. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения / А.И. Зорина, И.Я. Бозо, В.Л. Зорин [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – № 2. – С. 15–26.

34. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Н.И. Аюшинова, О.В. Каня // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 8–12.

35. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях : методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – Рязань : РИО РязГМУ, 2014. – 60 с. – ISBN 978-5- 8423-0154-6.

36. Функциональное состояние гортани и его динамика на фоне консервативного лечения пациентов вокально-речевых профессий с хроническим тонзиллитом / С.В. Старостина, Э.Е. Аветисян, О.В. Борисов, А.Б. Шебунина // Медицинский совет. – 2018. – № 8. – С. 58–62.

37. Харинцева, С.В. Значение интерлейкинов 17, 23 и антител к рецептору тиреотропного гормона в патогенезе эндокринной офтальмопатии / С.В. Харинцева, Е.С. Таскина // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2018. – Т. 14, № 2. – С. 72–80.

38. Челомбитько, М.А. Роль активных форм кислорода в воспалении^ мини-обзор / М.А. Челомбитько // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2018. – Т. 73, № 4. – С. 242–246.

39. Щетинин, С.А. Исследование бактерицидных свойств различных концентраций озонидов в составе озонированного оливкового масла *in vitro* / С.А. Щетинин, Ю.С. Шишкова, М.Ю. Коркмазов // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 25–27.

40. Эндоларингеальная микрохирургия доброкачественных новообразований гортани и объективная оценка их функциональных результатов / Д.М. Мустафаев, З.М. Ашуров, В.Г. Зенгер [и др.] // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. – 2008. – № 2. – С. 16–22.

41. Этиологические факторы нарушения голосовой функции у вокалистов музыкального театра / Н.Л. Кунельская, С.Г. Романенко, О.Г. Павлихин [и др.] // *Российская оториноларингология*. – 2020. – № 2. – С. 51–56.

42. Этиопатогенетическое лечение узелков голосовых складок у профессиональных вокалистов / Н.Л. Кунельская, С.Г. Романенко, О.Г. Павлихин [и др.] // *Вестник оториноларингологии*. – 2019. – № 2. – С. 13–17.

43. Al-Omiri, M.K. Comparison of dental bleaching effects of ozone and hydrogen peroxide: An ex vivo study / M.K. Al-Omiri, R.S. Abul Hassan, B.K. AlZarea, E. Lynch // *American Journal of Dentistry*. – 2016. – Vol. 29, № 5. – P. 251–254.

44. Alresheedi, M.T. Chemical cleaning of ceramic ultrafiltration membranes – Ozone versus conventional cleaning chemicals / M.T. Alresheedi, O.D. Basu, B. Barbeau // *Chemosphere*. – 2019. – Vol. 226. – P. 668–677.

45. Amin, L.E. Biological assessment of ozone therapy on experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats / L.E. Amin // *Biochemistry and Biophysics Reports*. – 2018. – Vol. 15. – P. 57–60.

46. A novel computational model predicts key regulators of chemokine gradient formation in lymph nodes and site-specific roles for CCL19 and ACKR4 / M. Jafarnejad, D.C. Zawieja, B.S. Brook [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 199, № 7. – P. 2291–2304.

47. Anti-Inflammatory and Tissue Regenerative Effects of Topical Treatment with Ozonated Olive Oil/Vitamin E Acetate in Balanitis Xerotica Obliterans / M. Curro, T. Russo, N. Ferlazzo [et al.]. – Text: electronic // *Molecules*. – 2018. –



Vol. 23, № 3. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017296/> (дата обращения: 29.07.2022).

48. Apoptosis in Vocal Fold Polyps / A.L. Hamdan, G. Tabet, Z. Saadeddin [et al.] // *Journal of Voice*. – 2018. – Vol. 32, № 1. – P. 104–108.

49. Application of a hybrid gravity-driven membrane filtration and dissolved ozone flotation (MDOF) process for wastewater reclamation and membrane fouling mitigation / X. Jin, W. Wang, S. Wang [et al.] // *Journal of Environmental Sciences (China)*. – 2019. – Vol. 81. – P. 17–27.

50. Application of ozone therapy in interventional medicine / K. Hao, S. Tang, H. Xie [et al.] // *Journal of Interventional Medicine*. – 2019. – Vol. 2, № 1. – P. 8–11.

51. Association between Chronic Laryngitis and Particulate Matter Based on the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008–2012 / Y.-H. Joo, S.-S. Lee, K.-do Han, K.-H. Park. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 7. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133180> (дата обращения: 09.03.2023).

52. Autoimmune Th17 cells induced synovial stromal and innate lymphoid cell secretion of the cytokine GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis / K. Hirota, M. Hashimoto, Y. Ito [et al.] // *Immunity*. – 2018. – Vol. 48, № 6. – P. 1220–1232.e5

53. Bacterial biofilm associated with chronic laryngitis / T.J. Kinnari, H. Lampikoski, T. Huuynen, A.A. Aarnisalo // *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery*. – 2012. – Vol. 138, № 5. – P. 467–470.

54. Bhattacharyya, N. The prevalence of voice problems among adults in the United States / N. Bhattacharyya // *Laryngoscope*. – 2014. – Vol. 124, № 10. – P. 2359–2362.

55. Bleaching efficiency of softwood thermomechanical pulps treated with ozone / C. Leduc, C. Daneault, É. Pelletier [et al.] // *Appita Journal*. – 2018. – Vol. 71, № 3. – P. 242–251.

56. Blumberg, R. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey / R. Blumberg, F. Powrie. – Text: electronic // *Science Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 4, № 137. – URL: [https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3004184?url\\_ver=Z39.88-2003&rfrid=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3004184?url_ver=Z39.88-2003&rfrid=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed) (дата обращения: 06.03.2023).

57. Bocci, V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects / V. Bocci // *Free Radical Research*. – 2012. – Vol. 46, № 9. – P. 1068–1075.

58. Bocci, V. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments / V. Bocci, G. Valacchi. – Text: electronic // *Frontiers in Chemistry*. – 2015. – Vol. 3. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389.fchem.2015.00004/full> (дата обращения: 01.03.2023).

59. Bohlender, J. Diagnostic and therapeutic pitfalls in benign vocal fold diseases / J. Bohlender // *Laryngorhinootologie*. – 2013. – Vol. 92, № 1. – P. 239–257.

60. Borrelli, E. Mechanism of action of oxygen ozone therapy in the treatment of disc herniation and low back pain / E. Borrelli // *Acta Neurochirurgica. Supplement*. – 2011. – Vol. 108. – P. 123–125.

61. Borrelli, E. The Use of Ozone in Medicine / E. Borrelli, V. Bocci // *Annals of Medical and Health Sciences Research*. – 2018. – Vol. 8. – P. 117–119.

62. Brodowska, A.J. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview / A.J. Brodowska, A. Nowak, K. Śmigielski // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2018. – Vol. 58, № 13. – P. 2176–2201.

63. Bromberg, P.A. Mechanisms of the acute effects of inhaled ozone in humans / P.A. Bromberg // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – Vol. 1860, № 12. – P. 2771–2781.

64. Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice / X. Liu, S. Wang, Y. You [et al.] // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156, № 7. – P. 2461–2469.

65. Chandel, N.S. Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles / N.S. Chandel // *Cell Metabolism*. – 2015. – Vol. 22, № 2. – P. 204–206.

66. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges / D. Wong, T.B. Nielsen, R.A. Bonomo [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2017. – Vol. 30, № 1. – P. 409–447.

67. Clinical grading of Reinke's edema / M. Tan, P.C. Bryson, C. Pitts [et al.] // *Laryngoscope*. – 2017. – Vol. 127, № 10. – P. 2310–2313.

68. Clinical practice guideline: hoarseness (dysphonia) (Update) / R.J. Stachler, D.O. Francis, S.R. Schwartz [et al.] // *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*. – 2018. – Vol. 158, № 1, suppl. – P. 1–42.

69. Coincidence of different structures of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the respiratory tract of children: no indications for enhanced mucosal immunostimulation in sudden infant death syndrome (SIDS) / A.S. Debertin, T. Tschernig, A. Schürmann [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2006. – Vol. 146, № 1. – P. 54–59.

70. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study / C.C. Lopes de Jesus, F.C. Dos Santos, L. M. O.B. de Jesus [et al.]. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 7. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179185> (дата обращения: 02.03.2023).

71. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples / N. Segata, S.K. Haake, P. Mannon [et al.]. – Text: electronic // *Genome Biology*. – 2012. – Vol. 13, № 6. – URL: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-6-r42> (дата обращения: 09.03.2023).

72. Correlation between Reflux and multichannel intraluminal impedance pH monitoring in untreated volunteers / M.E. Jette, E.A. Gaumnitz, M.A. Birchall [et al.] // *Laryngoscope*. – 2014. – Vol. 124, № 10. – P. 2345–2351.

73. Costa, T. Ozone therapy for low back pain. A systematic review / T. Costa, D. Linhares, D.S.M. Ribeiro // *Acta Reumatológica Portuguesa*. – 2018. – Vol. 43, № 3. – P. 172–181.

74. Critical review of long-term ozone exposure and asthma development / K. Zu, L. Shi, R. L. Prueitt [et al.] // *Inhalation Toxicology*. – 2018. – Vol. 30, № 3. – P. 99–113.

75. Croze, M.L. Ozone Atmospheric Pollution and Alzheimer's Disease: From Epidemiological Facts to Molecular Mechanisms / M. L. Croze, L. Zimmer // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2018. – Vol. 62, № 2. – P. 503–522.

76. Dardes, N. Ozone Therapy as a Complementary Treatment in Cardiovascular Diseases / N. Dardes, V. Covi, G. Tabaracci // *Integrative Cardiology: A New Therapeutic Vision* / ed. by M. Fioranelli. – Cham : Springer International Publishing, 2017. – P. 165–172.

77. Dassé, R. First-line treatment of exudative vocal fold-lesions by in-office local corticosteroid injection: A literature review / R. Dassé, E. De Monès Del Pujol // *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. – 2021. – Vol. 138, № 3. – P. 169–175.

78. Differential gene expression profiling of vocal fold polyps and Reinke's edema by cDNA microarray / S. Duflo, S. L. Thibeault, W. Li [et al.] // *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*. – 2006. – Vol. 115, № 9. – P. 703–714.

79. Ding, T. Dynamics and associations of microbial community types across the human body / T. Ding, P.D. Schloss // *Nature*. – 2014. – Vol. 509, № 7500. – P. 357–360.

80. Distribution and Appearance of Ki-67, IL-1 $\alpha$ , IL-10, and PGP 9.5 in Reinke's Oedema-Affected Larynx Tissue Compared with Control Tissue / V. Konopecka, M. Pilmane, D. Sumerags, G. Sumeraga. – Text: electronic // *Life (Basel)*. – 2021. – Vol. 11, № 12. – URL: <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/12/1379> (дата обращения: 02.03.2023).

81. Dworkin, J. P. Laryngitis: types, causes, and treatments / J. P. Dworkin // *Otolaryngologic Clinics of North America*. – 2008. – Vol. 41, № 2. – P. 419–436.

82. Effect of ozone on vascular endothelial growth factor (VEGF) and related inflammatory cytokines in rats with diabetic retinopathy / T.Y. Xie, W. Yan, J. Lou, X.Y. Chen. – Text: electronic // *Genetics and Molecular Research*. – 2016. – Vol. 15, № 2. – URL: <https://www.geneticsmr.com/articles/6403> (дата обращения: 01.03.2023).

83. Effects of mild ozonisation on gene expression and nuclear domains organization in vitro / C. Scassellati, M. Costanzo, B. Cisterna [et al.] // *Toxicology in Vitro*. – 2017. – Vol. 44. – P. 100–110.

84. Efficacy of microsurgery in Reinke's oedema evaluated by traditional voice assessment integrated with the Vocal Extent Measure (VEM) / T. Salmen, T. Ermakova, A. Schindler [et al.] // *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. – 2018. – Vol. 38, № 3. – P. 194–203.

85. Efficacy of Ozone and Selenium Therapy for Alcoholic Liver Injury: An Experimental Model / Y. Adali, H. A. Eroğlu, M. Makav, G. F. Guvendi // *In Vivo*. – 2019. – Vol. 33, № 3. – P. 763–769.

86. Exacerbated airway toxicity of environmental oxidant ozone in mice deficient in Nrf2 / H.Y. Cho, W. Gladwell, M. Yamamoto, S.R. Kleeberger. – Text: electronic // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – Vol. 2013. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/254069/> (дата обращения: 02.03.2023).

87. Exploring the potential of mild ozonisation in adipose tissue regeneration and differentiation / B. Cisterna, M. Costanzo, F. Boschi [et al.] // *European Journal of Histochemistry*. – 2019. – Vol. 63. – P. 9–10.

88. Expression of vascular permeability factor in human vocal cord polyps / P. Wu, T. Liu, M. Zheng, J. Chen // *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. – 2006. – Vol. 20, № 18. – P. 839–841.

89. Expressions of CCR7 and CXCR4 Are Associated with Differentiation in Gastrointestinal Cancer / C. Lu, S. Chen, F. Xu [et al.] // *Journal of Cancer Therapy*. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 49–53.

90. Galiè, M. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure / M. Galiè, V. Covi, G. Tabaracci. – Text: electronic // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, № 16. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4009> (дата обращения: 03.03.2023).

91. Genotypic and phenotypic expression of vocal fold polyps and Reinke's edema: a preliminary study / S. L. Thibeault, S. D. Gray, W. Li [et al.] // The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology. – 2002. – Vol. 111, № 4. – P. 302–309.

92. Gu, J.  $\beta$ -Defensin-2 is overexpressed in human vocal cord polyps / J. Gu, Y. Huang // European Archives of Oto-rhino-laryngology. – 2017. – Vol. 274, № 2. – P. 901–907.

93. Franco, R.A. Common Diagnoses and Treatments in Professional Voice Users / R.A. Franco, J.G. Andrus // Otolaryngologic Clinics of North America. – 2007. – Vol. 40, № 5. – P. 1025–1061.

94. Fuks, K. B. Skin damage by tropospheric ozone / K.B. Fuks, B. Woodby, G. Valacchi. – Text: electronic // Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete. – 2019. – Vol. 70, № 3. – P. 163–168. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00105-018-4319-y> (дата обращения: 02.03.2023).

95. Hajek, M. Anatomische Untersuchungen über Laryngödem (Aus dem Anatomischen Institut des prof. Dr. E. Lukerhahndl in Wien) / M. Hajek // Archiv für Klinische Chirurgie Berlin. – 1981. – Vol. 42. – P. 46–94.

96. Hanshew, A.S. Characterization and comparison of bacterial communities in benign vocal fold lesions / A.S. Hanshew, M.E. Jette, S.L. Thibeault. – Text: electronic // Microbiome. – 2014. – Vol. 2. – URL: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-2618-2-43> (дата обращения: 07.03.2023).

97. Hauser, M.A. Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes / M.A. Hauser, D.F. Legler // Journal of Leukocyte Biology. – 2016. – Vol. 99, № 6. – P. 869–882.

98. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone / M. Izadi, M. Bozorgi, M.S. Hosseine [et al.]. – Text: electronic // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – Vol. 97, № 48. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30508881/> (дата обращения: 02.03.2023).

99. *Helicobacter pylori* colonization in the larynges of patients with hoarseness / T.J. Fang, L.A. Lee, H.Y. Li [et al.] // *Laryngoscope*. – 2008. – Vol. 118, № 3. – P. 389–393.

100. High economic burden of caring for patients with suspected extraesophageal reflux / D.O. Francis, J.A. Rymer, J.C. Slaughter [et al.] // *The American Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 108, № 6. – P. 905–911.

101. Hirano, M. Videostroboscopic examination of the larynx / M. Hirano, D.M. Bless. – San-Diego : Singular, 1993. – 249 p.

102. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: Influence on retinoid X receptor alpha / B.N. Chorley, M.R. Campbell, X. Wang [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40, № 15. – P. 7416–7429.

103. Immunohistochemical analysis of vocal cord polyps applying markers of squamous cell carcinogenesis / T. Braut, M. Krstulja, B. Marijić [et al.] // *Pathology, Research and Practice*. – 2019. – Vol. 215, № 1. – P. 144–150.

104. Impact of ozone on claudins and tight junctions in the lungs / B.G. Kim, P.H. Lee, S.H. Lee [et al.] // *Environmental Toxicology*. – 2018. – Vol. 33, № 7. – P. 798–806.

105. Inappropriate survey design analysis of the Korean National Health and Nutrition Examination Survey may produce biased results / Y. Kim, S. Park, N.S. Kim, B. K. Lee // *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. – 2013. – Vol. 46, № 2. – P. 96–104.

106. Including viral infection data supports an association between particulate pollution and respiratory admissions / K. Fukuda, P. N. Hider, M. J. Epton [et al.] // *Australian and New Zealand Journal of Public Health*. – 2011. – Vol. 35, № 2. – P. 163–169.

107. Inflammation-associated microbiota in pediatric eosinophilic esophagitis / A.J. Benitez, C. Hoffmann, A.B. Muir [et al.]. – Text: electronic // *Microbiome*. – 2015. – Vol. 3. – URL: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-015-0085-6> (дата обращения: 06.03.2023).

108. Inflammatory cell signaling following exposures to particulate matter and ozone / Z. Yan, Y. Jin, Z. An [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – Vol. 1860, № 12. – P. 2826–2834.

109. Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter / H. Traboulsi, N. Guerrina, M. Iu [et al.]. – Text: electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, № 2. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/2/243> (дата обращения: 01.03.2023).

110. Inhibition of ROS and upregulation of inflammatory cytokines by FoxO3a promotes survival against *Salmonella typhimurium* / J. Joseph, E.S. Ametepe, N. Haribabu [et al.]. – Text: electronic // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms12748> (дата обращения: 02.03.2023).

111. Integration of focal vibration and intra-articular oxygen-ozone therapy in rehabilitation of painful knee osteoarthritis / T. Paolucci, F. Agostini, A. Bernetti [et al.]. – Text: electronic // *The Journal of International Medical Research*. – 2021. – Vol. 49, № 2. – URL: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300060520986705?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300060520986705?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed) (дата обращения: 02.03.2023).

112. Intraperitoneal Administration of Oxygen/Ozone to Rats Reduces the Pancreatic Damage Induced by Streptozotocin / D. Siniscalco, M.C. Trotta, A.L. Brigida [et al.]. – Text: electronic // *Biology*. – 2018. – Vol. 7, № 1. – URL: <https://www.mdpi.com/2079-7737/7/1/10> (дата обращения: 02.03.2023).

113. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region / P. Moi, K. Chan, I. Asunis [et al.] // *Proceedings*



of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91, № 21. – P. 9926–9930.

114. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result / L. Re, G. Martínez-Sánchez, M. Bordicchia [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 742. – P. 158–162.

115. Joo, Y.-H. Association between obesity and chronic laryngitis in women – data from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey / Y.-H. Joo, K.-D. Han, S.-S. Lee // *Obesity Facts*. – 2015. – Vol. 8, № 4. – P. 252–260.

116. Joo, Y.-H. Association of Hearing Loss and Tinnitus with Health-Related Quality of Life: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey / Y.-H. Joo, K.-D. Han, K. H. Park. – Text: electronic // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 6. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131247> (дата обращения: 07.03.2023).

117. Jung, S.J. Effects of environment pollution on the ocular surface / S.J. Jung, J.S. Mehta, L. Tong // *The Ocular Surface*. – 2018. – Vol. 16, № 2. – P. 198–205.

118. Kang, K.A. Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenetic Modification Contribute to Anticancer Drug Resistance / K.A. Kang, J.W. Hyun // *Toxicological Research*. – 2017. – Vol. 33, № 1. – P. 1–5.

119. Kendall, K.A. Laryngeal evaluation. Indirect laryngoscopy to high-speed digital imaging / K.A. Kendall, R.J. Leonard. – New York : Thieme, 2010. – 324 p. – ISBN 978-1-60406-272-4.

120. Khatri, I. Evaluation of effect of topical ozone therapy on salivary Candidal carriage in oral candidiasis / I. Khatri, G. Moger, N. A. Kumar // *Indian Journal of Dental Research*. – 2015. – Vol. 26, № 2. – P. 158–162.

121. Kim, K.H. A review on the human health impact of airborne particulate matter / K.H. Kim, E. Kabir, S. Kabir // *Environment International*. – 2015. – Vol. 74. – P. 136–143.

122. Konrad, H. Ozone therapy for viral hepatitis. What can be expected? / H. Konrad. – Text: electronic // *Journal of Ozone Therapy*. – 2019. – Vol. 3, № 4. –

URL: <https://ojs.uv.es/index.php/JO3T/article/view/15514> (дата обращения: 26.07.2022).

123. Koufman, J.A. Prevalence of reflux in 113 consecutive patients with laryngeal and voice disorders / J.A. Koufman, M.R. Amin, M. Panetti // *Otolaryngology – Head and Neck Surgery : Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. – 2000. – Vol. 123, № 4. – P. 385–388.

124. Li, Q. Intra-articular oxygen-ozone versus hyaluronic acid in knee osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials / Q. Li, X. Qi, Z. Zhang // *International Journal of Surgery*. – 2018. – Vol. 58. – P. 3–10.

125. Lim, W. Lifestyle-related factors and their association with metabolic syndrome in Korean adults: a population-based study / W. Lim, W.Y. So // *Journal of Physical Therapy Science*. – 2015. – Vol. 27, № 3. – P. 555–558.

126. Liu, T. Expression of transforming growth factor beta1 in human vocal fold polyps / T. Liu, P. Wu, M. Zheng // *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. – 2009. – Vol. 23, № 5. – P. 211–213.

127. Low Ozone Concentrations Differentially Affect the Structural and Functional Features of Non-Activated and Activated Fibroblasts. In Vitro / B. Cisterna, M. Costanzo, M.A. Lacavalla [et al.]. – Text: electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 18. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8466365/> (дата обращения: 29.07.2022).

128. Low ozone concentrations promote adipogenesis in human adipose-derived adult stem cells / M. Costanzo, F. Boschi, F. Carton [et al.]. – Text: electronic // *European Journal of Histochemistry*. – 2018. – Vol. 62, № 3. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6151336/> (дата обращения: 02.03.2023).

129. Lung transcriptional profiling: Insights into the mechanisms of ozone-induced pulmonary injury in Wistar Kyoto rats / W.O. Ward, A.D. Ledbetter, M.C. Schladweiler, U. P. Kodavanti // *Inhalation Toxicology*. – 2015. – Vol. 27, suppl. 1. – P. 80–92.

130. Major Ozonated Autohemotherapy Preconditioning Ameliorates Kidney Ischemia-Reperfusion Injury / E.B. Sancak, H. Turkön, S. Çukur [et al.] // *Inflammation*. – 2016. – Vol. 39, № 1. – P. 209–217.

131. Martínez-Sánchez, G. Potential cytoprotective activity of ozone therapy in SARS-CoV-2/COVID-19 / G. Martínez-Sánchez, A. Schwartz, V. Di Donna // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, № 5. – P. 389–401.

132. Masan, J. The possibilities of using the effects of ozone therapy in neurology / J. Masan, M. Sramka, D. Rabarova // *Neuro Endocrinology Letters*. – 2021. – Vol. 42, № 1. – P. 13–21.

133. Medical Ozone Effects and Innate Immune Memory in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Methotrexate+Ozone After a Second Cycle of Ozone Exposure / G.T. Oru, R. Viebahn-Haensler, E.G. Fernández [et al.]. – Text: electronic // *Chronic Pain Management*. – 2019. – Vol. 2, № 1. – URL: <https://www.gavinpublishers.com/article/view/medical-ozone-effects-and-innate-immune-memory-in-rheumatoid-arthritis-patients-treated-with-methotrexate-ozone-after-a-second-cycle-of-ozone-exposure> (дата обращения: 30.07.2022).

134. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients / L. Delgado-Roche, M. Riera-Romo, F. Mesta [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2017. – Vol. 811. – P. 148–154.

135. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis / S.L. Manoto, M.J. Maepa, S.K. Motaung [et al.] // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2018. – Vol. 25, № 4. – P. 672–679.

136. Menegon, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer / S. Menegon, A. Columbano, S. Giordano // *Trends in Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 22, № 7. – P. 578–593.

137. Merati, A.L. Acute and chronic laryngitis / A. L. Merati // *Cummings otolaryngology – head and neck surgery* / eds.: P. Flint, B.H. Haughey, V.J. Lund [et al.]. – 5<sup>th</sup> ed. – Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010. – P. 901–906.

138. Merry, T.L. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice / T.L. Merry, M. Ristow // *The Journal of Physiology*. – 2016. – Vol. 594, № 18. – P. 5195–5207.

139. Metabolic Syndrome and Chronic Laryngitis: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008 to 2010 / K. Chung-Soo, L. Seong-Soo, H. Kyung-do, J. Young-Hoon. – Text: electronic // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol. 94, № 43. – URL: [https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2015/10270/Metabolic\\_Syndrome\\_and\\_Chronic\\_Laryngitis\\_The.61.aspx](https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2015/10270/Metabolic_Syndrome_and_Chronic_Laryngitis_The.61.aspx) (дата обращения: 06.03.2023).

140. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone / G. Giuliani, G. Ricevuti, A. Galoforo, M. Franzini. – Text: electronic // *Ozone Therapy*. – 2018. – Vol. 3, № 3. – URL: <https://www.pagepressjournals.org/index.php/ozone/article/view/7971> (дата обращения: 26.07.2022).

141. Microbiome in reflux disorders and esophageal adenocarcinoma / L. Yang, N. Chaudhary, J. Baghdadi, Z. Pei // *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 207–210.

142. Microbiota in the throat and risk factors of laryngeal carcinoma / H. Gong, Y. Shi, X. Zhou [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – Vol. 80, № 23. – P. 7356–7363.

143. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway / M. Galiè, M. Costanzo, A. Nodari [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 124. – P. 114–121.

144. Minimizing the environmental impact of cleaning in winemaking industry by using ozone for cleaning-in-place (CIP) of wine bottling machine / V. Englezos, K. Rantsiou, F. Cravero [et al.] // *Journal of Cleaner Production*. – 2019. – Vol. 233. – P. 582–589.

145. Mitochondrial Retrograde Signaling in Mammals Is Mediated by the Transcriptional Cofactor GPS2 via Direct Mitochondria-to-Nucleus Translocation /

M.D. Cardamone, B. Tanasa, C.T. Cederquist [et al.] // *Molecular Cell*. – 2018. – Vol. 69, № 5. – P. 757–772.

146. Modulation by Ozone Therapy of Oxidative Stress in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: The Background for a Randomized Clinical Trial / B. Clavo, G. Martínez-Sánchez, F. Rodríguez-Esparragón [et al.]. – Text: electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 6. – URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7998838/> (дата обращения: 29.07.2022).

147. Molecular Pharmacology of NRH: Quinone Oxidoreductase 2: A Detoxifying Enzyme Acting as an Undercover Toxicifying Enzyme / E. Janda, F. Nepveu, B. Calamini [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2020. – Vol. 98, № 5. – P. 620–633.

148. Motohashi, H. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism / H. Motohashi, M. Yamamoto // *Trends in Molecular Medicine*. – 2004. – Vol. 10, № 11. – P. 549–557.

149. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals / P.M. Quirós, M.A. Prado, N. Zamboni [et al.] // *The Journal of Cell Biology*. – 2017. – Vol. 216, № 7. – P. 2027–2045.

150. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress / T.T. Schug, Q. Xu, H. Gao [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2010. – Vol. 30, № 19. – P. 4712–4721.

151. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells / A. Pecorelli, V. Bocci, A. Acquaviva [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2013. – Vol. 267, № 1. – P. 30–40.

152. NRF2 and the Hallmarks of Cancer / M. Rojo de la Vega, E. Chapman, D.D. Zhang [et al.] // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 34, № 1. – P. 21–43.

153. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer / I.I. Chio, S.M. Jafarnejad, M. Ponz-Sarvisé [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 166, № 4. – P. 963–976.

154. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming / Y. Mitsuishi, K. Taguchi, Y. Kawatani [et al.] // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 66–79.

155. Nrf2 Transcription Factor Can Directly Regulate mTOR: Linking Cytoprotective Gene Expression to a Major Metabolic Regulator That Generates Redox Activity / G. Bendavit, T. Aboukassim, K. Hilmi [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291, № 49. – P. 25476–25488.

156. 16S Community Profiling Identifies Proton Pump Inhibitor Related Differences in Gastric, Lung, and Oropharyngeal Microflora / R. Rosen, L. Hu, J. Amirault [et al.] // *The Journal of Pediatrics*. – 2015. – Vol. 166, № 4. – P. 917–923.

157. Ogawa, M. Is voice therapy effective for the treatment of dysphonic patients with benign vocal fold lesions? / M. Ogawa, H. Inohara // *Auris, Nasus, Larynx*. – 2018. – Vol. 45, № 4. – P. 661–666. 170

158. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: The effect of physical activity on cellular redox homeostasis / J. Kruk, H. Y. Aboul-Enein, A. Kładna, J. E. Bowser // *Free Radical Research*. – 2019. – Vol. 53, № 5. – P. 497–521.

159. Oxygen-ozone autohemotherapy against COVID-19 needs to fithighly experienced, customized, and standardized protocols to succeed / S. Chirumbolo, M. Franzini, V. Simonetti [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93, № 5. – P. 2580–2582.

160. Oxygen-ozone therapy as support and palliative therapy in 50 cancer patients with fatigue – A short report / U. Tirelli, C. Cirrito, M. Pavanello [et al.] // *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. – 2018. – Vol. 22, № 22. – P. 8030–8033.

161. Oxygen-Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders / A. de Sire, F. Agostini, L. Lippi [et al.]. – Text:

electronic // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 3. – URL: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/3/356> (дата обращения: 03.03.2023).

162. Ozone exposure during early pregnancy and preterm birth: A systematic review and meta-analysis / К.М. Rappazzo, J.L. Nichols, R.B. Rice, T.J. Luben. – Text: electronic // *Environmental Research*. – 2021. – Vol. 198. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8221456/> (дата обращения: 30.07.2022).

163. Ozone Gas: Scientific Justification and Practical Guidelines for Improvised Disinfection using Consumer-Grade Ozone Generators and Plastic Storage Boxes / R. Dennis, A. Cashion, S. Emanuel, D. Hubbard. – Text: electronic // *The Journal of Science and Medicine*. – 2020. – Vol. 2, № 1. – URL: <https://www.josam.org/josam/article/view/35> (дата обращения: 26.07.2022).

164. Ozone induces autophagy in rat chondrocytes stimulated with IL-1 $\beta$  through the AMPK/mTOR signaling pathway / X. Zhao, Y. Li, X. Lin [et al.] // *Journal of Pain Research*. – 2018. – Vol. 11. – P. 3003–3017.

165. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway / W. Xiao, H. Tang, M. Wu [et al.]. – Text: electronic // *Bioscience Reports*. – 2017. – Vol. 37, № 6. – URL: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/37/6/BSR20170658/57893/Ozone-oil-promotes-wound-healing-by-increasing-the> (дата обращения: 01.03.2023).

166. Ozone protects rat heart against ischemia-reperfusion injury: A role for oxidative preconditioning in attenuating mitochondrial injury / W. Meng, Y. Xu, D. Li [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Vol. 88. – P. 1090–1097.

167. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? / B. Clavo, N. Santana-Rodríguez, P. Llontop [et al.]. – Text: electronic // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2018. – Vol. 2018. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6151231/> (дата обращения: 26.07.2022).

168. Ozone therapy could attenuate tubulointerstitial injury in adenine-induced CKD rats by mediating Nrf2 and NF- $\kappa$ B / G. Yu, X. Liu, Z. Chen [et al.] // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 19, № 10. – P. 1136–1143.

169. Ozone therapy for diabetic foot / R. Kushmakov, J. Gandhi, O. Seyam [et al.] // *Medical Gas Research*. – 2018. – Vol. 8, № 3. – P. 111–115.

170. Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients / B. Clavo, N. Santana-Rodriguez, P. Llontop [et al.]. – Text: electronic // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2015. – Vol. 2015. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/480369/> (дата обращения: 02.03.2023).

171. Ozone Therapy Protects Against Rejection in a Lung Transplantation Model: A New Treatment? / N. Santana-Rodríguez, P. Llontop, B. Clavo [et al.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2017. – Vol. 104, № 2. – P. 458–464.

172. Ozone Treatment of Grapes During Withering for Amarone Wine: A Multimodal Imaging and Spectroscopic Analysis / B. Cisterna, F. Boschi, A.C. Croce [et al.] // *Microscopy and Microanalysis*. – 2018. – Vol. 24, № 5. – P. 564–573.

173. Ozonized Gel Against Four Candida Species: A Pilot Study and Clinical Perspectives / V. Monzillo, F. Lallitto, A. Russo [et al.]. – Text: electronic // *Materials (Basel)*. – 2020. – Vol. 13, № 7. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7178640/> (дата обращения: 29.07.2022).

174. Pestana, P.M. Prevalence of voice disorders in singers: systematic review and metaanalysis / P.M. Pestana, S. Vaz-Freitas, M.C. Manso // *Journal of Voice*. – 2017. – Vol. 31, № 6. – P. 722–727. 175

175. Phonosurgery of Reinke's edema with microdebrider / E. Grigaliute, M.N. Fiamingo, P.G. Albanese, I. La Mantia // *European Archives of Oto-rhino-laryngology*. – 2022. – Vol. 279, № 8. – P. 4053–4059.

176. Possible Therapeutic Effects of Ozone Mixture on Hypoxia in Tumor Development / M. Luongo, A. L. Brigida, L. Mascolo, G. Gaudino // *Anticancer Research*. – 2017. – Vol. 37, № 2. – P. 425–435.

177. Presence of dendritic cells, T lymphocytes, macrophages, B lymphocytes and glandular tissue in the human fetal larynx / C. Dietrich, P. Jecker, T. Tschernig, W.J. Mann // *Acta Otolaryngologica*. – 2004. – Vol. 124, № 7. – P. 833–838.



178. Proteomic Analysis of Vocal Fold Fibroblasts Exposed to Cigarette Smoke Extract: Exploring the Pathophysiology of Reinke's Edema / M. Gugatschka, B. Darnhofer, T. Grossmann [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2019. – Vol. 18, № 8. – P. 1511–1525.

179. Proton pump inhibitor therapy for suspected GERD-related chronic laryngitis: a meta-analysis of randomized controlled trials / M.A. Qadeer, C.O. Phillips, A.R. Lopez [et al.] // *The American Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 101, № 11. – P. 2646–2654.

180. Reinke's edema: a proposal for a classification based on morphological characteristics / M. de Vincentiis, M. Ralli, F. Cialente [et al.] // *European Archives of Oto-rhino-laryngology*. – 2020. – Vol. 277, № 8. – P. 2279–2283.

181. Relationship between socio-demographic characteristics and vocal fold nodules, polyps and oedema / J. Milovanovic, M. Vukasinovic, A. Jotic [et al.] // *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. – 2018. – Vol. 38, № 5. – P. 424–430.

182. Repeated ozone exposure exacerbates insulin resistance and activates innate immune response in genetically susceptible mice / J. Zhong, K. Allen, X. Rao [et al.] // *Inhalation Toxicology*. – 2016. – Vol. 28, № 9. – P. 383–392.

183. ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells / T. Hojo, N. Maishi, A.M. Towfik [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 28. – P. 45484–45495.

184. Rosul, M.V. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus / M.V. Rosul, B.M. Patskan // *Wiadomości Lekarskie*. – 2016. – Vol. 69, № 1. – P. 7–9.

185. Segal, L.N. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype / L.N. Segal. – Text: electronic // *Nature Microbiology*. – 2016. – Vol. 1. – URL: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201631> (дата обращения: 02.03.2023).

186. Sex differences in the relationship between metabolic syndrome and pulmonary function: the 2007 Korean National Health and Nutrition Examination

Survey / J.H. Choi, S. Park, Y.H. Shin [et al.] // *Endocrine Journal*. – 2011. – Vol. 58, № 6. – P. 459–465.

187. Shim, H.K. Intravascular Papillary Endothelial Hyperplasia of the Vocal Cord: A Case Report and Review of the Literature / H.K. Shim, M.R. Kim // *The American Journal of Case Reports*. – 2019. – Vol. 20. – P. 1664–1668. 193

188. Smoking influences the immunological architecture of the human larynx / L.E. Rees, P.H. Jones, O. Ayoub [et al.] // *Clinical Immunology*. – 2006. – Vol. 118, № 2-3. – P. 342–347.

189. Srikanth, A. Application of ozone in the treatment of periodontal disease / A. Srikanth, M. Sathish, A.V. Sri Harsha // *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. – 2013. – Vol. 5, suppl. 1. – P. S89–S94.

190. Srinivasan, S.R. Ozone: A paradigm Shift in Dental Therapy / S.R. Srinivasan, B.T. Amaechi // *Journal of Global Oral Health*. – 2019. – Vol. 2, № 1. – P. 68–77.

191. Stein, D.J. Incidence of chronic laryngitis / D.J. Stein, J.P. Noordzij // *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*. – 2013. – Vol. 122, № 12. – P. 771–774.

192. Suppression of Nrf2 attenuates adipogenesis and decreases FGF21 expression through PPAR gamma in 3T3-L1 cells / B. R. Kim, G. Y. Lee, H. Yu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 497, № 4. – P. 1149–1153.

193. Tavaluc, R. Reinke's Edema / R. Tavaluc, M. Tan-Geller // *Otolaryngologic Clinics of North America*. – 2019. – Vol. 52, № 4. – P. 627–635.

194. Th1, Th2, and Th17 cytokine involvement in thyroid associated ophthalmopathy / J. Shen, Z. Li, W. Li [et al.]. – Text: electronic // *Disease Markers*. – 2015. – Vol. 2015. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2015/609593/> (дата обращения: 09.03.2023).

195. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection / M. Song, Q. Zeng, Y. Xiang [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2018. – Vol. 17, № 2. – P. 2449–2455.

196. The Composition of Microbiome in Larynx and the Throat Biodiversity between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients and Control Population / H.L. Gong, Y. Shi, L. Zhou [et al.]. – Text: electronic // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, № 6. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0066476> (дата обращения: 07.03.2023).

197. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates / C. Franceschi, P. Garagnani, C. Morsiani [et al.]. – Text: electronic // *Frontiers in Medicine (Lausanne)*. – 2018. – Vol. 5. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00061/full> (дата обращения: 03.03.2023).

198. The effects of ozone on the acute phase of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats / Y. Dere Günal, Ö. Boybeyi Türer, P. Atasoy [et al.] // *Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi*. – 2020. – Vol. 26, № 5. – P. 651–656.

199. The effects of ozone therapy as an adjunct to the surgical treatment of peri-implantitis / S. C. Isler, B. Unsal, F. Soysal [et al.] // *Journal of Periodontal & Implant Science*. – 2018. – Vol. 48, № 3. – P. 136–151.

200. The effects of ozone therapy on caspase pathways, TNF- $\alpha$ , and HIF-1 $\alpha$  in diabetic nephropathy / A. Güçlü, H. A. Erken, G. Erken [et al.] // *International Urology and Nephrology*. – 2016. – Vol. 48, № 3. – P. 441–450.

201. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome / D.E. Beasley, A.M. Koltz, J.E. Lambert [et al.]. – Text: electronic // *Plos One*. – 2015. – Vol. 10, № 7. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=The10.1371/journal.pone.0134116> (дата обращения: 06.03.2023).

202. The human laryngeal microbiome: effects of cigarette smoke and reflux / E.J. Marie, K.A. Dill-McFarland, A.S. Hanshew [et al.]. – Text: electronic // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – URL: <https://www.nature.com/articles/srep35882> (дата обращения: 07.03.2023).

203. The Importance of Hypoxia-Inducible Factors (HIF-1 and HIF-2) for the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease / E.L. Kerber, C. Padberg, N. Koll

[et al.]. – Text: electronic // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 22. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8551> (дата обращения: 07.03.2023).

204. The isolation and characterisation of primary human laryngeal epithelial cells / L.E. Rees, S. Gunasekaran, F. Sipaul [et al.] // Molecular Immunology. – 2006. – Vol. 43, № 6. – P. 725–730.

205. The larynx as an immunological organ: immunological architecture in the pig as a large animal model / E. Barker, K. Haverson, C. R. Stokes [et al.] // Clinical and Experimental Immunology. – 2006. – Vol. 143, № 1. – P. 6–14.

206. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot / G. Martínez-Sánchez, S.M. Al-Dalain, S. Menéndez [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2005. – Vol. 523, № 1-3. – P. 151–161.

207. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain / N. Braidy, M. Izadi, A. Sureda [et al.] // Journal of Cellular Physiology. – 2018. – Vol. 233, № 4. – P. 2705–2714.

208. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases / A. Cuadrado, A.I. Rojo, G. Wells [et al.] // Nature Reviews. Drug Discovery. – 2019. – Vol. 18, № 4. – P. 295–317.

209. Tonti, E. NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction / E. Tonti, G. Galli, C. Malzone // Blood. – 2009. – Vol. 113, № 2. – P. 370–376.

210. Topical ozone therapy restores microbiome diversity in atopic dermatitis / J. Zeng, J. Dou, L. Gao [et al.]. – Text: electronic // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576919321873?via%3Dihub> (дата обращения: 26.07.2022).

211. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach / A. Cuadrado, G. Manda, A. Hassan [et al.] // Pharmacological Reviews. – 2018. – Vol. 70, № 2. – P. 348–383.

212. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes / M. Pajares, N. Jiménez-Moreno, Á. García-Yagüe [et al.] // *Autophagy*. – 2016. – Vol. 12, № 10. – P. 1902–1916.

213. Valacchi, G. Ozone mediators effect on “in vitro” scratch wound closure / G. Valacchi, C. Sticozzi, I. Zanardi // *Free Radical Research*. – 2016. – Vol. 50, № 9. – P. 1022–1031.

214. Vasconcelos, D. Vocal Fold Polyps: Literature Review / D. Vasconcelos, A. Gomes, C. Araújo // *International Archives of Otorhinolaryngology*. – 2019. – Vol. 23, № 1. – P. 116–124.

215. Viebahn-Haensler, R. Ozone in Medicine. The Low-Dose Ozone Concept and Its Basic Biochemical Mechanisms of Action in Chronic Inflammatory Diseases / R. Viebahn-Haensler, O.S. León Fernández. – Text: electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 15. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8346137/> (дата обращения: 30.07.2022).

216. Vocal fold fibroblasts immunoregulate activated macrophage phenotype / S.N. King, F. Chen, M.E. Jetté, S.L. Thibeault // *Cytokine*. – 2013. – Vol. 61, № 1. – P. 228–236.

217. Vocal Fold Fibroblasts in Reinke's Edema Show Alterations Involved in Extracellular Matrix Production, Cytokine Response and Cell Cycle Control / M. Grill, I. Lazzeri, A. Kirsch [et al.]. – Text: electronic // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, № 7. – URL: <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/7/735> (дата обращения: 03.03.2023).

218. Vocal polyps: clinical, morphological, and immunohistochemical aspects / R.H. Martins, J. Defaveri, S. Domingues, R.J. Silva // *Voice*. – 2011. – Vol. 25, № 1. – P. 98–106.

219. Voice Disorders: Etiology and Diagnosis / R.H. Martins, H.A. do Amaral, E.L. Tavares [et al.] // *Journal of Voice*. – 2016. – Vol. 30, № 6. – P. 761.e1–761.e9.

220. Waldapfel, R. Pathology of the subepitelial (Reinke`s) layer of vocal cords / R. Waldapfel // *Annals of Otology*. – 1940. – Vol. 49. – P. 647–656.

221. Wang, J.S. The role of laryngopharyngeal reflux in the pathogenesis of Reinke's edema / J.S. Wang, J.R. Li // *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. – 2016. – Vol. 30, № 24. – P. 1931–1934.

222. Wang, Z. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis / Z. Wang, A. Zhang, W. Meng // *European Journal of Pharmacology*. – 2018. – Vol. 835. – P. 82–93.

223. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology / M. Martinelli, F. Giovannangeli, S. Rotunno [et al.] // *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. – 2017. – Vol. 58, № 1. – P. E48–E52.

224. Yanagihara, N. Respiration and phonation: The functional examination of laryngeal disease / N. Yanagihara, H. von Leden // *Folia Phoniatica*. – 1967. – Vol. 19. – P. 153–166.

225. Zanicic, E. Field-analysis of potable water quality and ozone efficiency in ozone-assisted biological filtration systems for surface water treatment / E. Zanicic, J. Stavriniades, D.W. McMartin // *Water Research*. – 2016. – Vol. 104. – P. 397–407.