

# МЕСТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА-АЛЬФА2 В ТЕРАПИИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО РЕСПИРАТОРНОГО ПАПИЛЛОМАТОЗА

Плужников М.С.<sup>\*</sup>, Катинас Е.Б.<sup>\*</sup>, Рябова М.А.<sup>\*</sup>,  
Карпищенко С.А.<sup>\*</sup>, Сысоев К.А.<sup>\*\*</sup>, Чухловин А.Б.<sup>\*\*</sup>,  
Тотолян Арег А.<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Кафедра оториноларингологии с клиникой, Научно-практический центр стоматологии

<sup>\*\*</sup> Научно-методический центр по молекулярной медицине СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Рецидивирующий респираторный папилломатоз (РРП) – наиболее часто встречающаяся опухоль верхних дыхательных путей, ассоциированная с вирусом папилломы человека (ВПЧ). Целью работы было выявить особенности системного и местного иммунитета при РРП, оценить клиническую и иммунологическую эффективность местной терапии рекомбинантным интерфероном-альфа (rIFN $\alpha$ 2) и определить клинические и лабораторные показания к его назначению.

Под наблюдением находился 41 больной РРП. Обследование включало: гистологическое исследование папиллом, определение ДНК ВПЧ в папилломах методом ПЦР, определение фенотипа циркулирующих в крови лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>) методом проточной цитофлуориметрии. В ларингеальном секрете определялись уровни IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13 методом мультиплексного иммуноанализа. У всех больных РРП исходно выявлены сниженная функциональная активность Т-лимфоцитов при сохранении их количественных соотношений в пределах нормы и значительно сниженные количества Т-киллеров и естественных киллеров. В ларингеальном секрете обнаружены повышенные уровни цитокинов, модулирующих ответ по Th1-типу (IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ). Кроме того, выявлен высокий уровень IL-4, характерный для развития оппортунистического Th2-ответа. Ингаляции препарата «Интераль» или «Роферон» в дозе 1 млн. ЕД проводились 1 раз в день (курсовая доза 10-15 млн. ЕД) 13 пациентам после оперативного лечения с противорецидивной целью и 11 пациентам в качестве монотерапии. Эффективность монотерапии составила 45,5%, при полном регрессе опухоли и 45% при частичном регрессе. Наибольший эффект наблюдался при часто рецидивирующем ювенильном папилломатозе с агрессивным течением и гистологической картиной активно пролиферирующей опухоли. У больных с полным регрессом опухоли в ларингеальном секрете выявлены исходно высокие значения TNF $\alpha$  и индекса IL-4/IFN $\gamma$ . В процессе лечения rIFN $\alpha$ 2 отмечен рост уровней цитокинов, модулирующих иммунный ответ по Th1-типу (IFN $\gamma$ , IL-12, IL-2) и GM-CSF, снижение исходно высокого уровня IL-10, снижение уровней IL-4 и IL-13. При частичном регрессе уровни IFN $\gamma$ , IL-12, IL-2 и GM-CSF снижались по сравнению с исходными значениями и на протяжении всего курса лечения колебались в пределах нормальных значений, после отмены препарата наблюдался рост уровней IL-4 и IL-13. Таким образом, местная терапия rIFN $\alpha$ 2 эффективна при рецидивирующем респираторном папилломатозе с агрессивным течением. В качестве прогностического признака эффективности местной интерфероновой терапии могут служить

## Адрес для переписки:

197022, г.Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, д.6/8.

СПб ГМУ им.акад. И.П. Павлова.

Кафедра оториноларингологии с клиникой.

К.м.н. Катинас Елена Борисовна.

E-mail: elena\_katinas@mail.ru

исходно высокие значения  $\text{TNF}\alpha$  и индекса  $\text{IL-4/IFN}\gamma$  в ларингеальном секрете, а показателями эффективности лечения – повышение уровня  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$  и  $\text{IL-12}$  в сочетании со снижением (нормализацией) индекса  $\text{IL-4/IFN}\gamma$ .

**Ключевые слова:** рецидивирующий папилломатоз, местный иммунитет, иммунотерапия, рекомбинантный интерферон альфа2.

*Plouzhnikov M., Katinas E., Ryabova M., Karpishenko S., Syssoev K., Chukhlov A., Totolian A.*

#### **LOCAL APPLICATION OF RECOMBINANT INTERFERON-ALFA2 FOR TREATMENT OF RECURRENT RESPIRATORY PAPILLOMATOSIS**

**Abstract.** Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is the most frequently occurring tumour of the upper airways associated with a human papilloma virus (HPV). The aim of this study was to reveal some features of systemic and local immunity in RRP, to investigate clinical and immunological efficiency of local treatment with recombinant interferon- $\alpha$  (rIFN $\alpha$ ), and to determine clinical and laboratory indications to its administration. The study included forty-one patients with confirmed RRP. Their examination included histological examination of papillomas, detection of HPV DNA in papilloma tissues using PCR technique, phenotyping of circulating lymphocytes ( $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD25}^+$ ,  $\text{HLA-DR}^+$ ) by means of flow cytometry. The levels of  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-5}$ ,  $\text{IL-10}$ ,  $\text{IL-12}$ ,  $\text{IL-13}$  in laryngeal secretions were quantified by a multiplex immunoassay. In all cases, we revealed an initially decreased functional activity of T-lymphocytes, as well as low contents of T-killer and NK-cells. In laryngeal secretions, increased values of Th1-type-specific cytokines ( $\text{IFN}\gamma$  and  $\text{TNF}\alpha$ ) were found. Besides that, high levels of local  $\text{IL-4}$  were detected thus being typical to alternative Th2-type response.

Single inhalations 1000 000 ME of «Interal» or «Roferon» preparations were administered daily (a total of 10-15 millions ME per therapeutic course). Thirteen patients received the treatment after surgery, as an adjuvant therapy, and eleven patients underwent monotherapy. Complete tumor regression of tumors following this monotherapy was observed in 45,5% of the patients, whereas partial regression was registered in 45%. The effect was mostly expressed in frequently recurring juvenile papillomatosis with aggressive course and histological pattern of actively proliferating papilloma. In the patients with complete tumor regression, high initial levels of  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-4/IFN}\gamma$  ratios were revealed initially in laryngeal secretions. When rIFN6 was administered, an increase in Th1-type cytokines ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-12}$ ,  $\text{IL-2}$ ) and GM-CSF were revealed, as well as decrease of initially high levels of  $\text{IL-10}$ , like as lowered levels of  $\text{IL-4}$  and  $\text{IL-13}$ . In cases of partial tumor regression, the levels of  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IL-12}$ ,  $\text{IL-2}$  and GM-CSF were decreased against initial values, and in the course of treatment they fluctuated within normal reference values. Cancellation of the therapy was followed by increase in  $\text{IL-4}$  and  $\text{IL-13}$  levels.

Hence, the local rIFN $\alpha$  therapy is effective in controlling aggressive recurrent respiratory papillomatosis. Initial increase in  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-4/IFN}\gamma$  ratios in laryngeal secretions may be considered as favorable predictor of anticipated therapy, whereas increased levels of  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IL-2}$  and  $\text{IL-12}$  together with decrease (normalization) of  $\text{IL-4/IFN}\gamma$  ratio may reflect the efficiency of the treatment performed. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 5-6, pp 679-688)

## **Введение**

Рецидивирующий респираторный папилломатоз (РРП) – наиболее часто встречающаяся опухоль верхних дыхательных путей. По данным разных авторов, гортанные папилломы составляют от 15,9 до 57,5% от всех доброкачественных образований гортани [2]. Папиллома является доброкачественной опухолью, развивающейся из плоского или переходного эпителия. В связи с частым рецидивированием, бурным ростом и анатомической узостью просвета гортани, растущая опухоль приводит к нарушению голосообразовательной, а в последующем, при сужении ее просвета, и дыхательной функции органа. Выделяемые клинически, ювенильная и взрослая формы заболевания гистологически идентичны (фиброэпителиальная опухоль), однако существенно различаются по клиническому течению: при ювенильном папилломатозе отмечается высокая степень рецидивирования и чаще встречаются распространенные формы, а у взрослых есть риск малигнизации папиллом.

В этиопатогенезе заболевания основное значение имеет инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ). Основной причиной интереса к ВПЧ является его онкогенный потенциал, проявляющийся как в клинических наблюдениях малигнизации респираторных папиллом [13, 14, 15], так и в частом обнаружении ДНК ВПЧ в плоскоклеточных карциномах головы и шеи [16]. Частота озлокачествления респираторных папиллом, по данным разных авторов, составляет 2-3% [10].

Рецидивирование папиллом связывают с наличием латентной инфекции в морфологически здоровой ткани рядом с папилломами, что подтверждено обнаружением ВПЧ в неизмененном эпителии [6]. Вирус длительно может существовать латентно, не вызывая роста папиллом, а активизация процесса может быть спровоцирована угнетением иммунной системы вследствие любой другой причины: интеркуррентное заболевание, травма, инфекция и т.д.

Подобный взгляд на патогенез РРП, а также отсутствие этиотропного лечения данного заболевания диктует основные положения тактики ведения таких больных, включающие: тщательное, часто неоднократное, удаление папиллом; гистологическое исследование удалённых папиллом на предмет возможной их малигнизации; адъювантную медикаментозную терапию с целью увеличения сроков ремиссии.

В качестве противорецидивной терапии наиболее широко используются цитостатики и препараты рекомбинантного интерферона-альфа [9, 11, 12]. Известны противорецидивные способы лечения РРП следующими препаратами интерферонов: человеческим лейкоцитарным интерфероном, эгифероном, реафероном, реальдином, вифероном, рофероном-А, интроном-А и др. В целом, по данным различных авторов, эффективность интерферонотерапии составляет от 20 до 71,7%.

Системное применение препаратов интерферона имеет определенные особенности. Необходим длительный непрерывный курс лечения – до 6-12 месяцев; используются преимущественно парентеральные методы введения. Длительно вводимый больному экзогенный IFN в ряде случаев вызывает образование нейтрализующих антител.

Известны также токсические и побочные реакции на введение интерферона. Практически всегда возникает лихорадка с ознобом или без него, которая ослабевает в течение 3-5 дней. В течение первых 4 недель лечения возникает гранулоцитопения, которая иногда бывает настолько выраженной, что приходится прерывать лечение. Наконец, при длительном введении IFN могут наблюдаться изменения со стороны биохимических печеночных проб, а у некоторых больных отмечены такие симптомы, как головная боль, сухость во рту, выпадение волос, сенсорная нейропатия.

Учитывая вышеперечисленные сложности системного применения интерферонов, при лечении ограниченной локализации ВПЧ в слизистой оболочке гортани представляется оправданным использовать локальное введение препаратов интерферонов в виде аппликаций на слизистую оболочку, ингаляций [4], инъекций в слизистую оболочку непосредственно после удаления папиллом. Интерес представляет тот факт, что иммуномодулирующий эффект препаратов интерферона может зависеть от способа их введения [5]. Ранее нами было показано, что местное введение цитокинов, в ряде случаев, значительно эффективнее системного, так как по-

зволяет добиться активации органоспецифических субпопуляций эффекторных клеток иммунной системы с минимальным расходом препарата и риском развития побочных эффектов [3].

Целью данной работы было выявить особенности состояния системного и местного иммунитета пациентов с рецидивирующим респираторным папилломатозом, оценить клиническую и иммунологическую эффективность местной терапии  $\text{IFN}\alpha 2$  и определить клинические и лабораторные показания к проведению местной интерфероновой терапии при рецидивирующем респираторном папилломатозе.

## Материалы и методы

За период с 2003 по 2006 год в ЛОР клинике СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова под наблюдением находился 41 больной часто рецидивирующим папилломатозом гортани в возрасте от 16 до 69 лет. Из них 26 (63,4%) мужчин и 15 (36,6%) женщины.

Наиболее часто начало заболевания приходилось на ранний детский возраст (26,8%) и период полового созревания (14,6%) – ювенильный папилломатоз. В 31,9 % дебют заболевания приходился на 40-50-летний возраст – папилломатоз взрослых. Такое возрастное распределение начала заболевания подтверждается данными других авторов и возможно связано с периодами конституционального иммунодефицита и гормональных перестроек в организме.

Клиническое обследование больных включало: трансназальную фиброларингоскопию с видеозаписью и кадрами воспроизведением; исследование функции внешнего дыхания у больных с большим объемом папиллом (пневмоанализатор «РИД-123»), компьютерный анализ голоса (программное обеспечение «Sound Forge 4.5» и «Praat» спектральный анализ, сонограмма).

Распространённость заболевания оценивалась по классификации И.А. Вознесенской (1968) [1], согласно которой различают ограниченную (процесс поражает одну анатомическую область гортани) и распространённую формы папилломатоза (табл.1).

Наиболее часто папилломы локализовались на истинных голосовых складках (68,9%), преимущественно в передних отделах. Среди больных с распространённой формой папилломатоза преобладали пациенты с длительным анамнезом, неоднократно перенесшие оперативные вмешательства.

Табл. 1. ХАРАКТЕРИСТИКА РАСПРОСТРАНЁННОСТИ ПРОЦЕССА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОРМЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Распространённость процесса	Абсолютное количество больных	Относительное количество больных (%)
Ограниченный	10	24,4 %
Распространённый	31	75,6 %

Среди пациентов с распространенной формой папилломатоза у 6 больных наблюдалось сочетание папилломатоза гортани и глотки (мягкое небо, небные миндалины), у 3 больных диагностировано сочетание папилломатоза гортани, глотки и трахеи.

У 2 больных заболевание было диагностировано впервые, остальные 39 человек, перенесли до поступления в клинику от 1 до 20 операций при помощи традиционных хирургических методик под местной или общей анестезией. Длительность межрецидивного периода составила от 3 до 6 месяцев.

Гистологическое исследование биоптатов и удаленных папиллом проводилось при окрашивании препаратов по Папаниколау.

Определение ДНК ВПЧ в удалённых папилломах или браш-биоптатах со слизистой оболочки и её типирование производилось методом полимеразной цепной реакции.

Иммунологическое обследование, включающее определение фагоцитирующей активности нейтрофилов, функциональной активности клеток методом реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), фенотипа циркулирующих в крови лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD25^+$ ,  $HLA-DR^+$ ) методом проточной цитофлуориметрии проводилось 35 больным рецидивирующим респираторным папилломатозом до начала лечения.

Определение в ларингеальном секрете уровня  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $GM-CSF$ ,  $IL-2$ ,  $IL-4$ ,  $IL-5$ ,  $IL-10$ ,  $IL-12$ ,  $IL-13$  методом мультиплексного иммуноанализа с помощью анализатора белков «BioPlex» (Bio-Rad, США) проводилось 11 больным, получавшим ингаляции «Роферона» («Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария) в качестве монотерапии 5 раз: до лечения, через сутки и через пять суток после начала терапии, после окончания курса ингаляций и через 5 дней после курса лечения (исследование выполнено при финансовой поддержке в форме гранта Правительства Санкт-Петербурга).

Для определения значений нормы изучаемых цитокинов в ларингеальном секрете была обследована контрольная группа, которую составили практически здоровые лица молодого возраста ( $n=6$ , 18-30 лет), студенты 4 и 5 курсов СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. Критериями отбора в контрольную группу служили: отсутствие хронических соматических заболеваний и патологии ЛОР-органов, отсутствие аллергических реакций в анамнезе, а также отсутствие вредных привычек (курение, злоупотребление алкоголем). В день обследования дополнительно проводился осмотр с целью исключения острого воспалительного процесса верхних дыхательных путей.

Взятие ларингеального секрета осуществляли при непрямой ларингоскопии с помощью лаборатор-

ного дозатора в количестве 10 мкл. Материал разводили в 40 мкл ЭДТА.

Для всех образцов ларингеального секрета рассчитывали коэффициент  $IL-4/IFN\gamma$ . Оценка достоверности различия полученных результатов проводилась вычислением непараметрического критерия Манна-Уитни. Различие считалось достоверным при  $p<0,05$ .

### Методика лечения

В исследовании использовались препараты  $gINF\alpha 2$ : «Интераль» (ГосНИИОЧБ, Россия, регистрационный № 000697/01–2001) и «Роферон» («Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария, регистрационный №014755/01 – 2001).

С противорецидивной целью в раннем послеоперационном периоде (на 2-3 сутки после операции) ингаляционная терапия  $gINF\alpha 2$  проводилась 13 пациентам с рецидивирующим респираторным папилломатозом.

Ингаляции 1 млн. ЕД препарата «Интераль» или «Роферон», растворенного в 5 мл физиологического раствора проводились 1 раз в день с помощью компрессионного ингалятора «Бореал» («Флаем Нуова», Италия) (размер частиц при ингаляции 0,6-0,8 микрон). Курсовая доза составляла 10-15 млн. ЕД препарата.

В качестве монотерапии без оперативного лечения курс ингаляций  $gINF\alpha 2$  проведен 11 пациентам с рецидивирующим респираторным папилломатозом. Эти больные получали ингаляции 1 млн. ЕД препарата «Роферон», растворенного в 5 мл физиологического раствора, 1 раз в день с помощью компрессионного ингалятора «Бореал». Курсовая доза составляла 10-15 млн. ЕД препарата.

## Результаты

### Результаты вирусологического и гистологического обследования

При исследовании 24 препаратов удалённых папиллом и браш-биоптатов методом полимеразной цепной реакции ВПЧ 6/11 типов обнаружен в 10 случаях, 16/18 типов – 5 случаях, 6/8 типы – в 4 случаях, неидентифицированный ВПЧ в одном и ещё в четырех случаях ДНК ВПЧ обнаружено не было при гистологически подтверждённом диагнозе. При анализе данных вирусологического исследования нам не удалось провести какие-либо параллели между результатами этих исследований, клиническим течением заболевания и состоянием иммунной системы пациентов.

При изучении препаратов, окрашенных по Папаниколау, определена пролиферирующая плоскоклеточная папиллома с наличием специфического комплекса признаков, характеризующих ядро и ци-



топлазму эпителиальных клеток, обусловленных цитопатическим действием ВПЧ у всех пациентов (койлоцитарная атипия клеток). Необходимо отметить, что у больных с ювенильным папилломатозом опухоль характеризовалась как высоко пролиферирующая плоскоклеточная папиллома с наличием резко расширенных и полнокровных капилляров в строме. При папилломатозе взрослых в 12 (29,3%) случаев обнаружена плоскоклеточная папиллома с участками гиперкератоза, дисплазии 1-2 степени и низкой пролиферативной активностью.

### Результаты иммунологического обследования

У всех больных РПП показатели поглотительной активности нейтрофилов, а также спонтанной миграции гранулоцитов и мононуклеаров в РТМЛ не отличались от нормальных значений.

Отклонения от нормы при определении фенотипа циркулирующих в крови лимфоцитов были выявлены у 35 пациентов (85,4%). Необходимо отметить, что все эти больные характеризовались длительным и часто рецидивирующим течением патологического процесса. При анализе полученных данных не выявлено тенденции к уменьшению количества Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^-$ ), Т-хелперов ( $CD4^+CD8^-$ ) и Т-цитотоксических лимфоцитов ( $CD4^+CD8^+$ ). Однако содержание Т-лимфоцитов, положительных по CD25 – «раннему маркеру активации» было значительно снижено ( $6,5 \pm 2,3\%$  при норме 13-24% ( $p=0,042$ )). У всех пациентов определялось достоверно сниженное количество активированных Т-лимфоцитов ( $CD3^+HLA-DR^+$ ) – положительных по «позднему маркеру активации» ( $2,55 \pm 3,9\%$  при норме 8-20 %,  $p=0,012$ ).

Кроме того, отмечено значительно сниженное количество Т-киллеров ( $CD3^+(16+56)^+$ ) ( $p=0,023$ ) и естественных киллеров ( $CD3^+(16+56)^+$ ) ( $p=0,035$ ) по сравнению с нормой.

При изучении цитокинового состава ларингеального секрета больных рецидивирующим папилломатозом гортани были выявлены следующие закономерности.

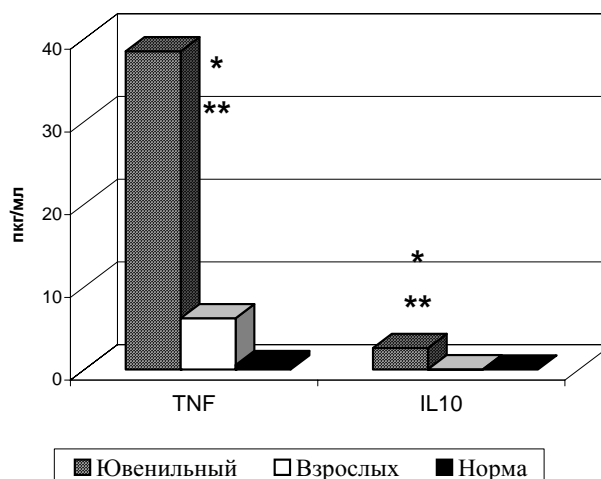


Рис.1. Уровни  $TNF\alpha$  и IL-10 в ларингеальном секрете больных с ювенильной и взрослой формами респираторного папилломатоза (\* – различия между группами больных достоверны при  $p<0,05$ , \*\* – различия по сравнению с нормой достоверны при  $p<0,05$ ).

Исходно в ларингеальном секрете у 24 обследованных больных с РПП выявлено достоверно повышенные уровни  $TNF\alpha$  ( $p=0,036$ ) и  $IFN\gamma$  ( $p=0,031$ ) по сравнению с группой контроля. Аналогичные изменения были выявлены для IL-4 ( $p=0,044$ ). Средние значения уровней цитокинов в ларингеальном секрете представлены в табл. 2.

Среднее значение концентрации IL-2 имело тенденцию к снижению по сравнению с группой контроля, однако отличие было статистически не достоверно. Концентрации IL-5 и IL-10 были близки к нулю. Отличие уровней других цитокинов от контрольной группы статистически доказаны не были.

Уровни  $TNF\alpha$  и IL-10 в группе больных с ювенильной формой папилломатоза значительно превышали таковые в ларингеальном секрете пациентов с папилломатозом взрослых и в контрольной группе (рис. 1).

### Результаты лечения

После ингаляционного введения первой дозы препаратов рекомбинантного интерферона-альфа2 у

Табл.2. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ ( $M \pm \sigma$ ) УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ (ПГ/МЛ) В ЛАРИНГЕАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ БОЛЬНЫХ РПП И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

	Больные РПП	Здоровые лица
$TNF\alpha$	$26,22 \pm 71,02$ *	$0,053 \pm 0,28$
$IFN\gamma$	$11,61 \pm 23,78$ *	$0,81 \pm 1,9$
GM-CSF	$50,33 \pm 90,9$	$9,5 \pm 8,33$
IL-2	$3,42 \pm 3,97$	$4,5 \pm 3,2$
IL-4	$4,03 \pm 6,6$ *	$0 \pm 0$
IL-5	$0,001 \pm 0,004$	$0 \pm 0$
IL-10	$0,0008 \pm 0,023$	$0 \pm 0$
IL-12	$3,33 \pm 8,9$	$0,11 \pm 0,19$
IL-13	$5,02 \pm 14,53$	$0,45 \pm 0,77$

\* – различия по сравнению со здоровыми лицами достоверны при  $p<0,05$

7(29,2%) пациентов наблюдался «гриппоподобный» синдром, включающий субфебрильную температуру тела, умеренную головную и мышечную боль. Проявления гриппоподобного синдрома длились от 2 до 5 часов, были выражены незначительно и не требовали медикаментозной коррекции. У всех больных в первые 2-3 суток наблюдалась гиперемия и отечность слизистой оболочки гортани и глотки.

В группе больных, получавших ингаляции интерферона с противорецидивной целью после оперативного удаления папиллом (13 человек), при дальнейшем наблюдении у 7 (53,8%) пациентов в течение 4-6 месяцев (в среднем через 4,9 месяцев) появились первые признаки рецидива роста папиллом: стелющиеся мелкозернистые папилломы в прежнем месте или продолженный рост. Необходимо отметить, что при наблюдении за данными больными до назначения терапии интерфероном средняя продолжительность межрецидивного периода составляла 3,8 месяца. Однако при проведении статистической обработки полученных результатов достоверного увеличения межрецидивного периода не наблюдалось ( $p = 0,12$ ). Данным больным (7 человек) снова начинали курс ингаляционной терапии интерфероном, на фоне которого у 2 пациентов был отмечен существенный регресс папиллом с улучшением или восстановлением голосовой функции, у 6 пациентов – полное их исчезновение. У остальных 6 пациентов (47,2%) рецидива заболевания не отмечено. Период динамического наблюдения составил от 9 до 16 месяцев.

В группе больных, получавших курс ингаляций рекомбинантного интерферона- $\alpha 2$  в качестве монотерапии без предварительного хирургического удаления папиллом (11 человек), у 5 (45,5%) пациентов был достигнут полный регресс папиллом и восстановление голосовой и дыхательной функции, у 5 (45,5%) наблюдалось значительное уменьшение объема папиллом с полным восстановлением дыхательной и значительным улучшением голосовой функции. После проведения курса ингаляций больные не требовали оперативного лечения. У 1 пациентки динамики не наблюда-

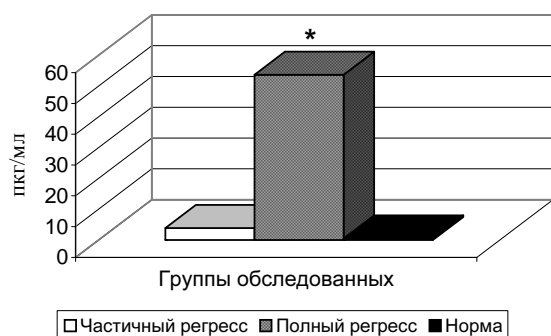
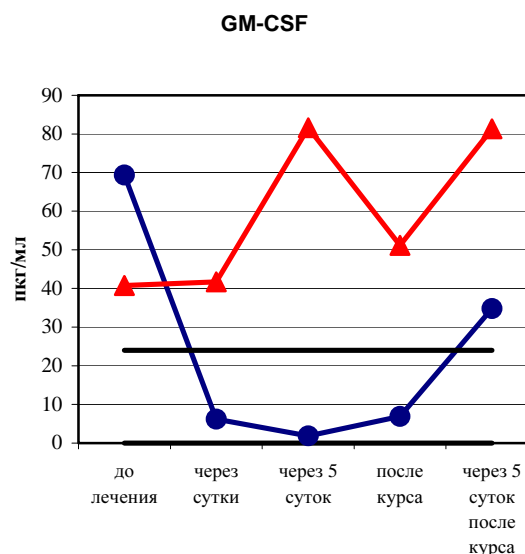
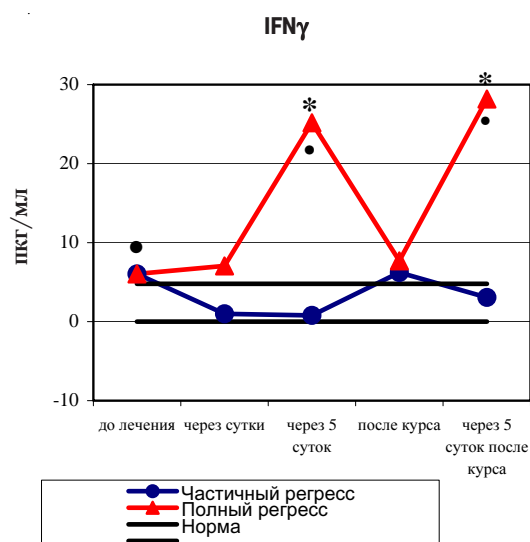
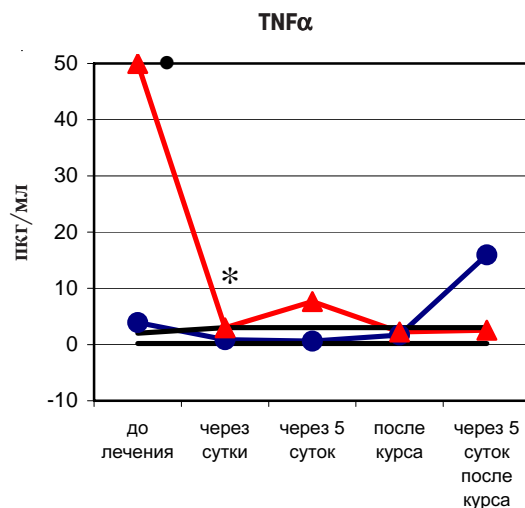


Рис. 2. Исходные уровни TNF $\alpha$  в ларингеальном секрете больных РРП в зависимости от результата лечения и здоровых лиц. (\* – различия между группами больных достоверны при  $p < 0,05$ ).



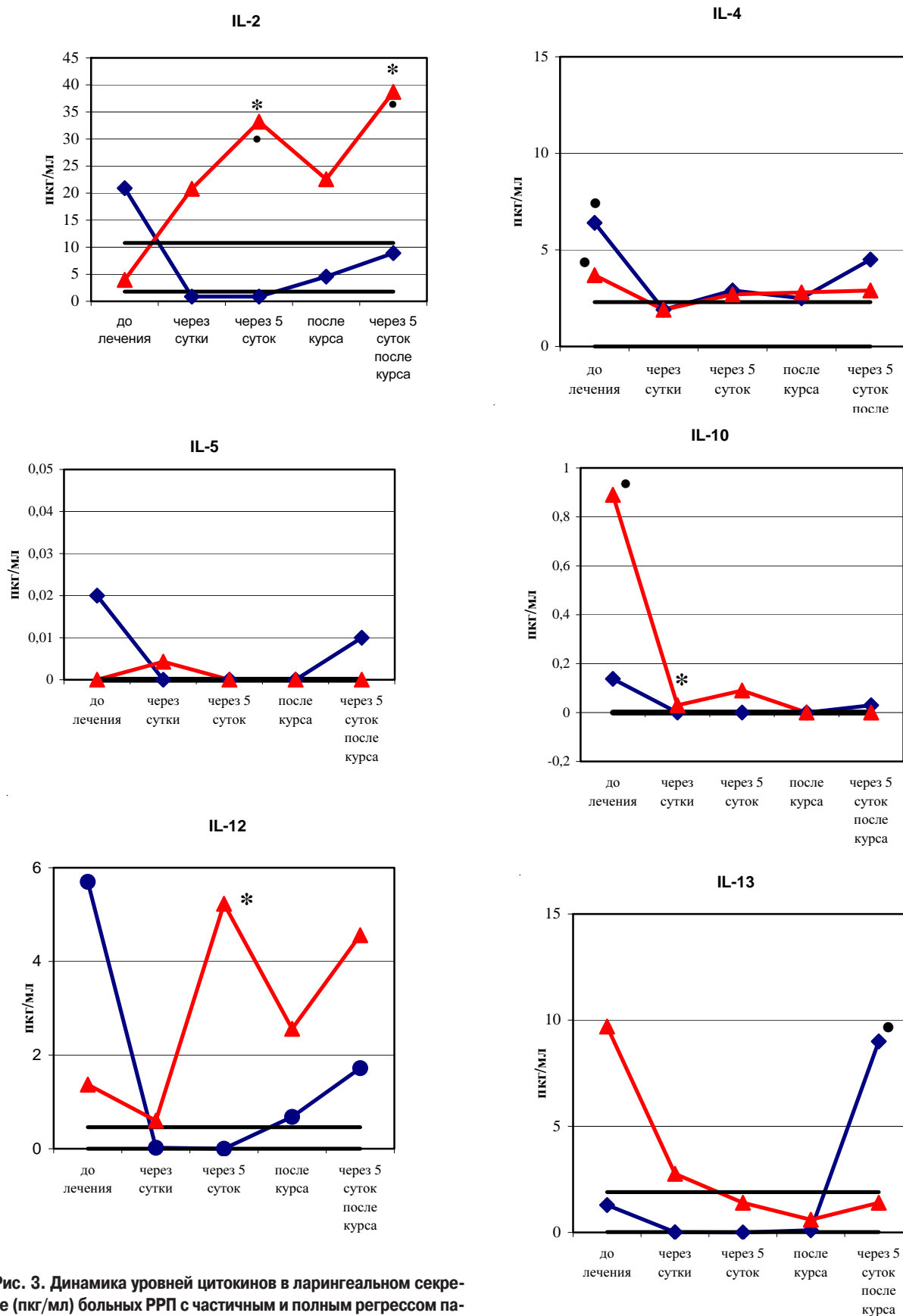


Рис. 3. Динамика уровней цитокинов в ларингеальном секрете (пкг/мл) больных РРП с частичным и полным регрессом папиллом в результате лечения (\* – различия с исходными значениями достоверны при  $p < 0,05$ , • – различия с нормой достоверны при  $p < 0,05$ ).

◆ Частичный регресс  
 ▲ Полный регресс  
 — Норма

лось, ей в дальнейшем было проведено оперативное вмешательство.

При анализе субпопуляций лимфоцитов в периферической крови после проведения местной терапии рекомбинантным интерфероном была отмечена тенденция к нормализации количества естественных киллеров ( $CD3^+(16+56)^+$ ) и лимфоцитов, положительных по CD25, однако выявленные изменения были статистически недостоверны.

При анализе динамики уровней цитокинов в ларингеальном секрете больных РРП в процессе монотерапии интерфероном- $\alpha 2$  были выявлены следующие закономерности. В группе больных с полным регрессом опухоли в результате лечения выявлялись более высокие исходные уровни  $TNF\alpha$ , чем у больных с частичным регрессом новообразования ( $p=0,017$ ) (рис.2).

Динамика уровней цитокинов в ларингеальном секрете больных РРП в процессе терапии представлена на рисунке 3.

В группе больных с полным регрессом папиллом уже через сутки после начала лечения наблюдалось постепенное увеличение в ларингеальном секрете уровней  $IFN\gamma$ , IL-12, IL-2 по сравнению с исходными значениями. Максимальные значения уровней данных цитокинов достигались к пятому дню лечения, при статистической обработке наблюдались достоверные отличия от исходных показателей ( $p=0,023$  для  $IFN\gamma$ ,  $p=0,02$  для IL-12 и  $p=0,015$  для IL-2). Тенденция к росту сохранялась и через 5 суток после окончания курса лечения. Для GM-CSF отмечена та же динамика, однако изменения были статистически не достоверны. В группе больных с частичным регрессом опухоли уровни  $IFN\gamma$ , IL-12, IL-2 и GM-CSF через сутки снижались по сравнению с исходными значениями и на протяжении всего курса лечения колебались в пределах нормальных значений. При статистическом анализе достоверных изменений уровней данных цитокинов не наблюдалось.

У пациентов с полным регрессом папиллом через сутки после начала лечения выявлено достоверное снижение исходно повышенных уровней  $TNF\alpha$  ( $p=0,045$ ) до нормальных значений. В дальнейшем значения концентраций данного цитокина не отличались от нормы. В группе с частичным регрессом папиллом достоверных изменений уровня  $TNF\alpha$  в процессе терапии не выявлено.

При анализе динамики IL-4, IL-10 и IL-13 в обеих группах больных через сутки после начала лечения выявлено постепенное снижение уровней этих цитокинов. Причем в группе с полным регрессом папиллом уже через сутки наблюдалось достоверное снижение исходно высокого уровня IL-10 ( $p=0,038$ ). Уровни IL-4, IL-10 и IL-13 у этих пациентов на протяжении курса лечения не отличались от нормальных значений. В группе с частичным регрессом опухоли через 5 суток после окончания курса терапии наблюдалась тенденция к росту уровней IL-4 и IL-13 ( $p=0,047$ ). Достоверных отличий уровней IL-5 от исходных показателей и от контрольной группы в процессе лечения отмечено не было.

При сравнении уровней IL-4 и  $IFN\gamma$  в ларингеальном секрете больных РРП и вычислении индекса IL-4/ $IFN\gamma$  в группе больных с полным регрессом папиллом отмечено постепенное уменьшение исходно высоких значений индекса IL-4/ $IFN\gamma$  и развитие иммунного ответа по Th1-типу. В контрольной группе значения индекса IL-4/ $IFN\gamma$  составили  $0\pm 0$ . После отмены интерферона значения IL-4/ $IFN\gamma$  у больных с полным регрессом папиллом приближались к значениям контрольной группы (табл. 3). В группе больных с частичным регрессом папиллом сохранялись повышенные значения индекса IL-4/ $IFN\gamma$ .

## Обсуждение

По литературным данным, клиническое течение респираторного папилломатоза, определяющееся

Табл. 3. ДИНАМИКА IL-4/ $IFN\gamma$  В ЛАРИНГЕАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ ПАЦИЕНТОВ С РРП

Пациенты	IL-4/ $IFN\gamma$		
	До лечения	В ходе лечения	После отмены
Пациенты с полным регрессом папиллом			
1	1,46	0	0
2	0	2,5	1,2
3	60	0	0
4	43	0	0
5	0	0	0
M $\pm\sigma$	20,89 $\pm$ 28,62**	0,5 $\pm$ 1,1	0,24 $\pm$ 0,53*
Пациенты с частичным регрессом папиллом			
1	0,26	90	0
2	2,4	0	0
3	0	45	6,25
4	0	4	10
5	4,7	0	20
M $\pm\sigma$	1,47 $\pm$ 2,07	27,8 $\pm$ 39,6**	7,25 $\pm$ 8,31* **

\* – различия между группами больных достоверны при  $p<0,05$ , \*\* - различия по сравнению с нормой достоверны при  $p<0,05$ .



интенсивностью роста папиллом, зависит не столько от типа вируса, сколько от особенностей макроорганизма. В нашем исследовании у всех пациентов выявлен дефект иммунной системы, заключающийся в сниженной функциональной активности Т-лимфоцитов при сохранении их количественных соотношений в пределах нормы. Кроме того, отмечены значительно сниженные количества Т-киллеров и естественных киллеров, которые являются основными эффекторами специфического и неспецифического звеньев противовирусной защиты соответственно. На местном уровне выявлен дисбаланс Th1/Th2 иммунных реакций. В ларингеальном секрете больных РРП обнаружены высокие уровни цитокинов, модулирующих ответ по Th1-типу (IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) характерный для противовирусной иммунной защиты. Кроме того, выявлен высокий уровень IL-4, характерный для развития оппортунистического Th2-ответа. Неоднозначность местных иммунных реакций подтверждается сниженным или нормальным уровнем IL-2 и IL-12, повышение которых можно ожидать при развитии противовирусного иммунного ответа.

Учитывая изложенные выше изменения в иммунной системе больных РРП, а также наличие хорошо развитой системы местного иммунитета верхних дыхательных путей, представлялось целесообразным использовать при данной патологии локальное введение препаратов интерферонов. Так, Brandtzaeg P. и соавторы сообщают в своих исследованиях, что Т-лимфоциты выявляются в lamina propria слизистой оболочки верхних дыхательных путей как единично расположенные клетки или в виде небольших скоплений, расположенных в подэпителиальной области, а также в эпителиальном слое между клетками эпителия, так называемые «интраэпителиальные лимфоциты». Применение иммуногистохимического метода с использованием меченых моноклональных антител к различным мембранным молекулам, экспрессируемым лимфоцитами, позволило отнести их к клеткам CD3<sup>+</sup> фенотипа и выделить среди них две основные субпопуляции: CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Небольшая часть «интраэпителиальных лимфоцитов» (IEL) имеет фенотип CD57<sup>+</sup>, присущий натуральным киллерам. Количественные соотношения и локализация клеток основных иммунорегуляторных субпопуляций в слизистой оболочке полости носа, по данным P.Brandtzaeg и соавторов (1996), подвержены значительным индивидуальным колебаниям [7]. Тем не менее, общей тенденцией является относительно низкое содержание Т-клеток CD8<sup>+</sup> фенотипа среди IEL (30%) и значительное преобладание CD4<sup>+</sup> (65%) в эпителиальном слое и lamina propria слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Явное преобладание Т-хелперной субпопуляции клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup> резко отличает слизистую оболочку

дыхательных путей от слизистой оболочки интестинального тракта, где Т-клетки CD8<sup>+</sup> фенотипа составляют подавляющее большинство IEL [8].

В ходе местного применения rIFN $\alpha$ 2 отмечена тенденция к росту уровней цитокинов, модулирующих иммунный ответ по Th1-типу (IFN $\gamma$ , IL-12, IL-2), максимум которых достигался к 5 суткам. Это, вероятно, связано с действием rIFN $\alpha$ 2 на «интраэпителиальные лимфоциты» слизистой оболочки (естественные киллеры и Т-лимфоциты), а также макрофаги, их активацией и секрецией этими клетками IFN $\gamma$ , IL-2 и IL-12. Рост уровней IFN $\gamma$ , IL-2 и IL-12 и нормализация индекса IL-4/IFN $\gamma$  в ходе лечения наблюдались только у пациентов с полным регрессом опухоли, что может свидетельствовать о том, что регресс опухоли достигается не только вследствие прямого действия rIFN $\alpha$ 2 на репликацию ВПЧ, но и в результате иммуномодулирующего действия данного препарата, потенцирующего противовирусный иммунный ответ на местном уровне. У этой группы больных в ходе терапии также наблюдалось снижение исходно высокого уровня IL-10, противовоспалительного цитокина, характерного для развития оппортунистического гуморального иммунного ответа по Th2-типу, что еще раз подтверждает сдвиг местных иммунных реакций в результате действия препаратов rIFN $\alpha$ 2 в сторону клеточно-опосредованных. Ингаляционное введение rIFN $\alpha$ 2 вызывало также незначительное снижение уровней других противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-13. Однако после отмены препаратов интерферона в ларингеальном секрете пациентов с частичным регрессом опухоли наблюдался рост уровней этих цитокинов.

В данном исследовании нами показана эффективность местного ингаляционного применения препаратов рекомбинантного интерферона у пациентов с рецидивирующим папилломатозом гортани в качестве монотерапии (эффективность данного способа лечения составила 45,5%, при полном регрессе опухоли). Интерес представляет следующее наблюдение: при анализе результатов клинического и гистологического исследования выраженный эффект от местного применения интерферона наблюдался у пациентов с часто рецидивирующими ювенильными папилломами, агрессивным течением и гистологической картиной активно пролиферирующей папилломы с наличием расширенных и полнокровных капилляров в строме. Эти характеристики патологического процесса могут служить клиническими показаниями к ингаляционному назначению препаратов рекомбинантного интерферона. Данное наблюдение возможно объясняется механизмом действия интерферона (выраженным антипролиферативным действием, основанным на блокировании репликации вируса).

В качестве прогностического признака эффективности местной интерфероновой терапии могут

служить исходно высокие значения  $TNF\alpha$  и индекса IL-4/IFN $\gamma$  в ларингеальном секрете, а показателями эффективности лечения – повышение уровня IFN $\gamma$ , IL-2 и IL-12 в сочетании со снижением (нормализацией) индекса IL-4/IFN $\gamma$ .

По нашему мнению, регресс быстрорастущих папиллом на фоне ингаляционной терапии интерфероном позволяет в некоторых случаях проводить консервативное лечение вместо хирургического. Сократить количество оперативных вмешательств, проводя курсы ингаляционной терапии при первых признаках рецидива с хорошим функциональным эффектом, а также сократить объем опухоли, уменьшив при этом объем оперативного вмешательства и вероятность послеоперационных осложнений (кровотечение, рубцевание). Отказ от хирургического метода лечения снижает риск иммунодепрессивных состояний, вызванных самим оперативным вмешательством, что само по себе удлиняет период клинической ремиссии.

Назначение ингаляционной интерфероновой терапии в послеоперационном периоде позволяет удлинить межрецидивный период и сократить вероятность возникновения продолженного роста папилломы.

## Благодарности

Исследования были поддержаны грантом для молодых кандидатов медицинских наук вузов и академических институтов Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга (PD 06-4.0-13)

## Список литературы

1. Вознесенская И.А. Папилломы верхних дыхательных путей / Л: Медгиз, 1974. - С.63-91.
2. Иванченко Г.Ф., Каримова Ф.С. Профилактика и лечение папилломатоза гортани / Заболевания голосового аппарата верхних дыхательных путей. - 2001. - С.111-113.
3. Плужников М.С., Лавренова Г.В., Катинас Е.Б., Галкина О.В., Тотолян А.А. Эффективность местной иммунотерапии гнойных синуситов с использованием препаратов рекомбинантных интерлейкинов человека // Российская Ринология. - 2002. - №2. - С.119-122.
4. Плужников М.С., Рябова М.А., Карпищенко С.А., Катинас Е.Б., Марфичева Н.А., Зуева Е.Е., Чухловин А.Б., Тотолян А.А. К вопросу о комбиниро-

ванном лечении рецидивирующего папилломатоза гортани // Болезни органов дыхания. - 2004. - №1. - С. 22-25.

5. Ющук Н.Д., Змызгова А.В., Тугутова И.В., Онуфриева Е.К., Прицкер А.Д. Иммуномодулирующие свойства лейкинферона // Сов. медицина. - 1990. - №7. - С.11-14.

6. Bomholt A. Juvenile laryngeal papillomatosis. An epidemiological study from the Copenhagen region. // Acta otolaryngol. - 1988; Vol.5. - №3. - P. 367-371.

7. Brandtzaeg P., Jahnsen F.L., Farstad I.N., Haraldsen G. Immunobiology and immunopathology of the upper airway mucosa // Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratorae. - 1996. - Vol.2. - №1-2. - P.22-31.

8. Brandtzaeg P., Inger N. Farstad Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track // Immunology Today. - 1999. - 20. - P.267-277.

9. Deunas L., Alcantud V., Alvares F. Use of interferon-a in laryngeal papillomatosis: eight years of the Cuban national programme // J. Laryngol 1997. - Vol.111. - № 2. - P.134-140.

10. Gaylis B., Hayden R.E. recurrent respiratory papillomatosis: progression to invasion and malignancy // Amer.J.Otolaryngol. - 1991. - Vol.12. - №2. - P.104-112.

11. Kashima H.K., Leventhal B.G., Week P.W. Randomized surgical adjuvant trial of interferon alfa-n1 in recurrent papillomatosis. // Arch. Otolaryngol. Head Neck. Surg. - 1993. -Vol.114. - №2 - P.1163-1169.

12. Leventhal B.G., Kashima H.K. Randomized surgical adjuvant trial of interferon alfa-1 in recurrent papillomatosis // Arch. Otolaryngol. Head Neck surg. - 1988. -Vol.114. - №10. - P.1163-1169.

13. Mahnke C., Frohlich O., Lippert B. Recurrent laryngeal papillomatosis: retrospective analysis of 95 patients and review of the literature // Otolaryngol. Pol. - 1996. - Vol.50. - №6. -P. 567-578.

14. Ocphanidou D, Dimakou K., Latsi P. Recurrent respiratory papillomatosis with malignant transformation in a young adult // Resp. Med. - 1996. - Vol.90. - №1. - P. 53-55.

15. Shamboul K. Stomal malignant transformation of respiratory papilloma, with neck metastasis: case report // East. Afr. Med. J. -1996. -Vol.73. - №5. - P.336-338.

16. Steinberg B.M., Dilorenzo T.R. A possible role for human papilloma viruses in head and neck cancer // Cancer metastasis Rev. - 1996. - Vol.5. - №1. - P.91-112.

поступила в редакцию 16.04.2006

принята к печати 21.06.2006