

*М.Б. САМБУР, Д.І. ЗАБОЛОТНИЙ, Т.Д. САВЧЕНКО,
Т.А. ЗАЄЦЬ, М.Д. ТИМЧЕНКО*

ХАРАКТЕРИСТИКА ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ ХВОРИХ НА ПАПІЛОМАТОЗ ГОРТАНІ ДО ТА ПІСЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ПРОТИВІРУСНОЇ КВАДРИВАЛЕНТНОЇ ВАКЦИНИ

*ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»,
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)*

Віруси папіломи людини (ВПЛ), яких ідентифіковано близько 70 типів, на сьогоднішній день вважаються одними з небезпечних інфекційних агентів, які є етіологічними чинниками розвитку хронічних запальних та неопластичних процесів, здатними вражати слизову оболонку ротової порожнини, епітелій шкіри, середнього вуха та ін. З папіломатозом респіраторного тракту перш за все пов'язують віруси 6 та 11, рідше – 8, 16, 18, 30, 31 типів. Вважається, що клінічний перебіг захворювання не залежить від типу вірусу, проте відомо, що типи 16 та 18 ВПЛ визначають найбільш агресивний перебіг захворювання [3, 4, 12, 14]. Частота малігнізації респіраторного папіломатозу, за даними різних авторів, складає 2-3 %. Незважаючи на існування великої кількості методів протирецидивної терапії папіломатозу гортані, рецидивуючий характер захворювання обумовлює пошук нових методів та схем лікування. В останні роки у науковій літературі з'явилися повідомлення про успішне застосування противірусних вакцин для профілактики ВПЛ-опосередкованих захворювань сечостатевої системи, що дозволяє передбачити доцільність їх використання при респіраторному папіломатозі, про що свідчать і поодинокі роботи, які вказують на ефективність застосування вакцин при папіломатозі гортані з агресивним рецидивуючим перебігом [10, 15].

Одним з найважливіших чинників, які визначають стійкість або чутливість до ві-

русів папіломи людини (ВПЛ), є стан імунологічної реактивності організму [4, 7-9, 11]. Метою нашого дослідження стало визначення показників клітинного та гуморального імунітету у хворих на папіломатоз гортані до та після хірургічного лікування та проведення протирецидивної терапії.

Матеріали та методи

Дослідження стану системи імунітету були проведені у 21 хворих на папіломатоз гортані (ПГ). Комплексне лікування пацієнтів складалось з хірургічного видалення папілом та курсу протирецидивної терапії, який включав інтраопераційне введення амінокапронової кислоти внутрішньовенно, в післяопераційному періоді – лаферобіон інгаляційно в дозі 300 000 од. №10 та вітамінно-мінеральний антиоксидантний комплекс (віт. А, Е, С, Se, Zn, Cu). Крім того, хворі отримали курс вакцинації квадริвалентною (проти вірусу папіломи людини 6, 11, 16 и 18 типів) противірусною вакциною «Гардасил» (Merck & Co, США), який складався із 3 доз та проводився за схемою 0 – 2 – 6 міс.: перша доза – в призначений день, друга – через 2 міс. після першої, третя – через 6 міс. після першої дози. Повторне дослідження показників імунологічної реактивності хворих проводили через 2-12 міс. після комплексного лікування.

Отримані дані співставляли з аналогічними показниками у практично здорових осіб контрольної групи (n=10).

Дослідження показників крові хворих здійснювали, одержуючи сироватку крові та виділяючи мононуклеарні клітини в градієнті щільності фіколл-верографіна. Імунологічну реактивність хворих оцінювали, визначаючи субпопуляційний склад лімфоцитів крові (кількість CD3⁺-, CD4⁺- та CD8⁺-клітин) за допомогою реакції розеткоутворення з частками, покритими моноклональними антитілами до лімфоцитарних CD-маркерів [6], а також рівень функціональної активності природних цитотоксичних клітин (ПЦК) [5], вміст імуноглобулінів класів M, G, A методом радіальної імунодифузії в гелі [13], циркулюючих імунних комплексів (ЦК) в сироватці крові [1].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням непараметричного критерію U Вілкоксона-

Манна-Уїтні за допомогою пакету програм для статистичної обробки біометричних даних WinPEPI та за методом кутового перетворення Фішера [2].

Результати та їх обговорення

Результати досліджень, представлені в табл. 1, показують, що у хворих на ПГ суттєво зменшена кількість клітин Т-системи імунітету, переважно за рахунок її CD4⁺-субпопуляції. Проведене лікування сприяло нормалізації числа CD4⁺-Т-лімфоцитів хелперів/індукторів в периферичній крові хворих протягом першого року після вакцинації. Кількість CD8⁺-Т-лімфоцитів ефекторів/супресорів у хворих на ПГ до та після лікування змінюється несуттєво і практично не відрізняється від аналогічних показників у обстежених осіб контрольної групи.

Таблиця 1

Показники Т-клітинного імунітету у хворих на ПГ до та після лікування

Показники, %	Кількість клітин, %		
	до лікування (n=13)	після лікування (n=11)	контрольна група (n=14)
CD3 ⁺ Т-лімфоцити	45,4* (33,0-60,0)	52,6 (44,0-62,0)	54,1 (40,0-65,0)
CD4 ⁺ Т-лімфоцити	28,9** (17,0-46,0)	34,2 (26,0-45,0)	35,6 (27,0-41,0)
CD8 ⁺ Т-лімфоцити	19,4 (10,0-31,0)	18,4 (14,0-26,0)	21,1 (14,0-28,0)

Примітки: в дужках подані межі коливань; * - P<0,05; ** - P<0,01 по відношенню до контролю.

Як відомо, серед клітинних реакцій реактивності у хворих на ПГ важливу роль як для перебігу, так і для прогнозу захворювання відіграють показники функціональної активності природних цитотоксичних клітин.

Проведені дослідження показали, що середні показники рівнів природної цитотоксичної активності (ПЦА) мононуклеарних клітин периферичної крові хворих на ПГ склали в середньому 22,5% деструкції клітин-мішеней і достовірно не відрізнялись від показників у осіб контрольної групи (табл. 2). Після проведеного лікування середньостатистичне значення активності

природних цитотоксичних клітин крові хворих в стадії ремісії мало тенденцію до зниження. При дослідженні рівнів функціональної активності ПЦК крові було відзначено, що у хворих на ПГ значно розширені межі індивідуальних значень цих показників, які коливались від 0 до 63,4 % у порівнянні із такими у осіб контрольної групи, які визначались в межах 11,0-32,8 %, що стало підставою для визначення нами числа осіб з нормальним, зниженим або підвищеним рівнем ПЦА в групах обстежених.

Отримані результати засвідчили, що середньостатистичне значення активності природних цитотоксичних клітин крові

хворих в стадії ремісії мало тенденцію до зниження внаслідок зменшення числа пацієнтів із суттєво стимульованою функціональною активністю ПЦК. Протягом першого

року після лікування частка осіб з нормальними значеннями цитотоксичної активності цих клітин збільшилась до 40 % проти 23,5% у хворих до лікування ($P=0,05$).

Таблиця 2

Рівні природної цитотоксичної активності мононуклеарних клітин крові хворих на ПГ до та після лікування

Статистичні показники	Рівень ПЦА, %		
	до лікування (n=17)	після лікування (n=10)	контрольна група (n=14)
Середні значення	22,5	18,2	23,9
Межі коливань	0,0-63,4	0,0-65,2	11,0-32,8
Достовірність відмінностей	>0,05	>0,05	

Стан гуморальних механізмів захисту хворих на ПГ оцінювали, визначаючи вміст сироваткових імуноглобулінів різних класів та циркулюючих імунних комплексів (ЦІК).

Аналіз досліджень вмісту сироваткових імуноглобулінів різних класів показує, що у хворих на ПГ, при порівнянні з даними здорових донорів, визначається збільшення кількості сироваткового IgM, зокрема, у 7 хворих (33,3 % обстежених) рівень IgM перевищує верхню межу показників контрольної групи. Концентрація цього імуноглобуліну після лікування демонструє тенденцію до подальшого збільшення (табл. 3). Так, після лікування кількість IgM була збільшеною більш ніж у половини пацієнтів (58,3%, $P<0,01$). Ці дані співпадають з результатами визначення загального IgE в сироватці крові хворих на ПГ, яке показало, що у більш ніж половини хворих спостерігається суттєве підвищення його вмісту порівняно з практично здоровими донорами контрольної групи з подальшим збільшенням середніх значень цього показника після лікування [9]. Гіперпродукція імуноглобулінів цих ізотипів є свідченням високого рівня реагування низки гуморальних реакцій організму як в умовах дисфункції клітинної ланки імунної відповіді у хворих на ПГ, так і у відповідь на стимуляцію цих реакцій після проведення протирецидивної терапії із застосуванням специфічної противірусної вакцини.

Показник вмісту сироваткового IgG у більшості пацієнтів не виходив за межі фізіологічних значень та не зазнав після лікування суттєвих коливань.

Підвищений в сироватці крові у хворих на ПГ вміст IgA після лікування зменшувався практично до значень групи контролю, проте у 4 хворих він все ще перевищував верхню межу фізіологічних коливань цього імуноглобуліну.

Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів показало, що у хворих на ПГ показники ЦІК суттєво перевищують такі у осіб контрольної групи (табл. 4). Після проведеного лікування концентрація ЦІК в крові хворих на ПГ зменшувалась і в середньому достовірно не відрізнялась від показників в групі контролю.

Визначення відносної кількості хворих, що мали нормальні та підвищені показники ЦІК до та після лікування показало, що до лікування у 56% хворих були нормальні, а у 44% – підвищені показники ЦІК в сироватці крові; після проведеної терапії кількість хворих з нормальними рівнями ЦІК збільшилась до 82% ($P<0,05$).

Таким чином, одержані результати досліджень вказують на те, що у хворих на ПГ визначаються суттєві порушення показників клітинного та гуморального імунітету, які проявляються зменшенням загальної кількості Т-лімфоцитів, переважно за рахунок їх

CD4⁺-субпопуляції, різноспрямованими змінами функціональної активності природних цитотоксичних клітин, гіперімуноглобулінеміями класів М та А, збільшенням рівня ЦІК.

Результати повторних досліджень імунологічної реактивності хворих показали, що проведене лікування сприяло норма-

лізації більшості змінених показників імунологічної реактивності протягом першого року після вакцинації. Зокрема, було відзначено збільшення загальної кількості Т-лімфоцитів крові та їх CD4⁺-субпопуляції, нормалізацію стимульованої функціональної активності ПЦК, рівнів ЦІК, зменшення рівня Іg А в сироватці крові.

Таблиця 3

Кількість імуноглобулінів основних класів в сироватці крові хворих до та після лікування

Групи хворих	Показники			
	значення	IgM, г/л	IgG, г/л	IgA, г/л
До лікування	СЗ	1,5*	11,5	2,6
	МК	0,9 – 2,8	7,2 – 15,7	0,7 – 7,6
	n	21	21	21
Після лікування	СЗ	1,4	11,0	1,9
	МК	0,8 – 2,8	9,0 – 15,0	0,5 – 3,2
	n	12	12	12
Контрольна група	СЗ	1,1	12,0	1,8
	МК	0,5-1,6	10,5 -15,0	1,0-2,40
	n	10	10	10

Примітки: СЗ – середнє значення; МК – межі коливань; n – кількість обстежень; * – достовірність розбіжностей з контролем, P<0,05.

Таблиця 4

Кількісні показники ЦІК у хворих на РП до та після лікування

Показники	Показники ЦІК, у. о.		
	хворі до лікування	хворі після лікування	контрольна група
СЗ	67,6 *	45,7	28,0
МК	7,0-155,0	5,0-95,0	0,0-62,0
n	18	11	15

Примітки: СЗ – середнє значення; МК – межі коливань; n – кількість обстежень; * – достовірність розбіжностей з контролем, P<0,05.

Одержані результати свідчать про те, що використання в післяопераційному періоді лікування хворих на РП протирецивного комплексу з курсом вакцинації протівірусною вакциною «Гардасил» призводить до корекції більшості визначених порушень імунологічної реактивності, на тлі яких перебігають клінічні прояви захворювання. Разом з тим, визначені у хво-

рих на РП в різні періоди спостереження зміни показників імунологічної реактивності свідчать про суттєві порушення у них імунного гомеостазу, спричинені хронічною персистуючою вірусною інфекцією, і можуть служити обґрунтуванням доцільності проведення подальшого моніторингу клініко-імунологічних показників цих хворих.

Література

1. Белозеров Е.С. Преципитационный метод исследования иммунных комплексов у больных вирусным гепатитом В / Е.С. Белозеров, Т.А. Макарова // Лаб. дело. – 1982. – №12. – С.741-743.
2. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е.В. Гублер. – Л.: Медицина, 1978. – 296 с.
3. Дмитриев Г.А. Папилломавирусная инфекция / Г.А. Дмитриев, О.А. Биткина. – М.: Мед. книга. – 2006. – 76 с.
4. Лазаренко Л.М. Папіломавірусна інфекція та система інтерферону / Л.М. Лазаренко, М.Я. Співак, О.М. Михайленко, Г.Т. Сухих. – Київ, 2005. – 288 с.
5. Мельников О.Ф. Сравнение радиоизотопного и спектрофотометрического метода определения цитотоксичности клеток / О.Ф. Мельников, Т.А. Заяц // Лаб. диагностика. – 1998. – №1. – С.43-45.
6. Новиков Д.К. Метод определения Т- и В-лимфоцитов на основе моноклональных антител / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков // Иммунология. – 2000. – №2. – С.31-33.
7. Самбур М.Б. Стан клітинного та гуморального імунітету у хворих на передракові захворювання гортані / М.Б. Самбур, Д.І. Заболотний, Т.Д. Савченко, Т.А. Заєць та ін. // Журн. вушних, носових та горлових хвороб. – 2011. – №4. – С.2-6.
8. Самбур М.Б. Динаміка змін імунного гомеостазу у хворих на передракові захворювання верхніх дихальних шляхів після комплексного лікування / М.Б. Самбур, Д.І. Заболотний, Т.Д. Савченко, Л.Д. Кривохатська, Т.А. Заєць, М.Д. Тимченко, Ю.В. Кікот // Журн. вушних, носових та горлових хвороб. – 2012. – №4. – С.9-13.
9. Самбур М.Б. Продукція імуноглобуліна Е у хворих на папіломатоз гортані / М.Б. Самбур // Журн. вушних, носових та горлових хвороб. – 2016. – №2. – С.4-7.
10. Anita Jeyakumar, Mitchell R. HPV Vaccination and Recurrent Respiratory Papillomatosis / A. Jeyakumar, R. Mitchell // Otolaryngology – Head and Neck Surgery. – 2011. – Vol. 144. – P. 133.
11. Bonagura V.R. Recurrent Respiratory Papillomatosis. A complex defect in responsiveness to human papillomavirus-6 and -11 / V.R. Bonagura, L.J. Hatam, D.W. Rosenthal, J.A. DeVoti, F. Lam, B.M. Steinberg, A.L. Abramson // APMIS. – 2010. – Vol. 118 (6-7). – P. 455-470.
12. Brian J. Wiatrak. Overview of recurrent respiratory papillomatosis / Brian J. Wiatrak // Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery. – 2003. – Vol. 11. – P. 433-441.
13. Jerne N. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells / N. Jerne, A. Nordin // Science. – 1963. – V. 140. – P.405.
14. Larson D.A. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis / D.A. Larson, C.S. Derkay // APMIS. – 2010. – Vol. 118(6-7). – P. 450-454.
15. Magdalena Chirila. Clinical efficiency of quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) vaccine in patients with recurrent respiratory papillomatosis / M. Chirila, S.D. Boldoaca // European Archives of Otorhinolaryngology and Head and Neck. – 2014. – Vol. 271. – P. 1135-1142.

References

1. Belozеров ES, Makarova TA. Precipitation method of immune complexes investigation in patients with viral hepatitis B. *Laboratornoe delo*. 1982;(12):741-43. Russian.
2. Gubler EV. Computational methods of analysis and recognition of pathological processes. *Leninograd: Medicine*; 1978. 296p. Russian.
3. Dmitriev GA, Bitkina OA. HPV infection. *Moscow: Medical book*; 2006. 76p. Russian.
4. Lazarenko LM, Spivak MYa, Mikhailenko OM, Sukhykh GT. HPV infection and interferon system. *Kyiv*; 2005. 288p. Ukrainian.
5. Melnikov OF, Zayets TA. Comparison of radioisotope and spektrofotometric method for determining cell cytotoxicity. *Laboratornaya diagnostika*. 1998;(1):43-5. Russian.
6. Novikov DK, Novikov PD. Method of determining the T- and B-lymphocyte based on monoclonal antibody. *Immunologiya*. 2000;(2):31-3. Russian.
7. Sambur MB, Zabolotny DI, Savchenko TD, Zayets TA, Timchenko SV, Timchenko MD, Kikot JV, Kostyuchenko AL. Cellular and humoral immunity in patients with precancerous laryngeal disease. *Zhurnal vushnyh, nosovyh i gorlovyh hvorob*. 2011;(4):2-6. Ukrainian.
8. Sambur MB, Zabolotny DI, Savchenko TD, Kryvohatska LD, Zaets TA, Timchenko MD, Kikot JV. Evolution of immune homeostasis in patients with precancerous diseases of the upper respiratory tract after complex treatment. *Zhurnal vushnyh, nosovyh i gorlovyh hvorob*. 2012;(4):9-13. Ukrainian.
9. Sambur MB. Immunoglobulin E production in patients with laryngeal papillomatosis. *Zhurnal vushnyh, nosovyh i gorlovyh hvorob*. 2016;(2):4-7. Ukrainian.
10. Anita Jeyakumar and Ron Mitchell. HPV Vaccination and Recurrent Respiratory Papillomatosis.

- Otolaryngology – Head and Neck Surgery. 2011;(144):133.
11. Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, DeVoti JA, Lam F, Steinberg BM, Abramson AL. Recurrent Respiratory Papillomatosis. A complex defect in responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. APMIS. 2010;118(6-7):455-70.
 12. Brian J. Wiatrak. Overview of recurrent respiratory papillomatosis. Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery. 2003;(11):433-41.
 13. Jerne N, Nordin A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science. 1963;(140):405.
 14. Larson DA, Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. APMIS. 2010;118(6-7):450-454.
 15. Magdalena Chirila, Sorana D. Boldoaca. Clinical efficiency of quadrivalent HPV (types 6/11/16/18) vaccine in patients with recurrent respiratory papillomatosis. European Archives of Otorhinolaryngology and Head and Neck. 2014;(271):1135-42.

Надійшла до редакції 10.10.16

© М.Б. Самбур, Д.І. Заболотний, Т.Д. Савченко, Т.А. Засць, М.Д. Тимченко, 2016

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ БОЛЬНЫХ ПАПИЛЛОМАТОЗОМ ГОРТАНИ ДО И ПОСЛЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОТИВИРУСНОЙ КВАДРИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ

Самбур М.Б., Заболотный Д.И., Савченко Т.Д., Засць Т.А., Тимченко М.Д. (Киев)

А н н о т а ц и я

Устойчивое течение, частые рецидивы и недостаточно эффективное лечение респираторного папилломатоза обуславливает актуальность исследования состояния иммунологической реактивности больных, от которой в значительной мере зависит клиническое течение заболевания и эффективность его лечения.

Целью работы было определение клеточных и гуморальных показателей иммунологической реактивности больных папилломатозом гортани до и после хирургического лечения, а также проведения противорецидивной терапии

Материалы и методы: Определение функциональной активности естественных клеток-киллеров, субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови, уровней сывороточных иммуноглобулинов основных классов и циркулирующих иммунных комплексов проведено у больных до и через 2-12 мес. после комплексного лечения, которое включало хирургическое удаление папиллом и противорецидивную терапию в виде ингаляций лаферобиона, приема витаминно-минерального комплекса и курса вакцинации противовирусной квадριвалентной вакциной.

Результаты. Исследования иммунологической реактивности больных папилломатозом гортани выявили у них существенные нарушения показателей клеточного и гуморального иммунитета в виде разнонаправленных изменений функциональной активности естественных клеток-киллеров, уменьшения общего количества Т-лимфоцитов, в основном за счет CD⁴⁺-субпопуляции, гипериммуноглобулинемии М и А классов, повышения уровня циркулирующих иммунных комплексов.

Комплексное лечение с использованием в послеоперационном периоде квадριвалентной противовирусной вакцины Гардасил способствовало нормализации большинства измененных у больных показателей иммунологической реактивности.

Выводы. Полученные результаты указывают на перспективность использования противовирусной вакцины в качестве противорецидивирующего средства у больных с ПГ и показывают целесообразность проведения дальнейшего клинического и иммунологического мониторинга в разные сроки после вакцинации.

Ключевые слова: папилломатоз гортани, иммунологическая реактивность, противорецидивная терапия, квадριвалентная противовирусная вакцина.

**CHARACTERISTICS OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN PATIENTS
WITH LARYNGEAL PAPILLOMATOSIS BEFORE AND AFTER COMPLEX TREATMENT
WITH INTEGRATED ANTIVIRUS QUADRIVALENT VACCINE**

Sambur M.B., Zabolotnyy D.I., Savchenko T.D., Zayats T.A., Timchenko M.D.

*State Institution "O.S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology of National Academy
of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv; e-mail: sbsambur@mail.ru*

A b s t r a c t

Background. Recurring course, frequent relapses and lack of effective treatment of respiratory papillomatosis causes the relevance of the investigation of immune reactivity state in patients, from which the clinical picture of the disease and the effectiveness of its treatment largely depends on.

The aim of this study was to determine the parameters of cellular and humoral immunity in patients with laryngeal papillomatosis (LP) before and after surgical and antirelapse treatment

Materials and methods. Blood NK-cells cytotoxic activity, subpopulations of T-cells contents, serum immunoglobulines of main classes and circulating immune complexes (CIC) level was determined in patients with laryngeal papillomatosis before and after 2-12 months after complex treatment, which included surgical removal of papillomas and antirelapse therapy – laferobion inhalations, vitamin-mineral complex and vaccination course with antiviral quadrivalent vaccine.

Results. A significant violations of cellular and humoral immune indices including multidirectional changes in NK cytotoxic cells functional activity, decrease of the total number of T-lymphocytes, mainly due to CD⁴⁺-subpopulation, M- and A-classes hyperimmunoglobulinemia, increased CIC levels were determined in patients with LP. Postoperative complex treatment with antiviral quadrivalent "Gardasil" vaccine contributed to the normalization of the most identified violations of patients immunological reactivity.

Conclusion. The results indicate the prospects of antiviral quadrivalent vaccine use as antirelapse drug and showed the usefulness of further clinical and immunological monitoring of patients with laryngeal papillomatosis in different periods after vaccination course.

Keywords: laryngeal papillomatosis, immunological reactivity, antirelapse therapy, antiviral quadrivalent vaccine.