

УДК 618.146-006.6:612.017.1:615.37

Д.К. Кенбаева

**КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ:
СРАВНЕНИЕ ВАРИАНТОВ ИММУНОТЕРАПИИ***Городской онкологический диспансер, Астана, Республика Казахстан***Контактная информация:***Кенбаева Динара Кумаровна, канд. мед. наук, заведующая отделением гинекологии Городского онкологического диспансера***адрес:** Республика Казахстан, г. Астана, пр-т Шакарима Кудайбердиева, д.24/1, кв. 116; тел. 8(701)543-0599**e-mail:** dikenb@mail.ru

Статья поступила 31.08.2012, принята в печать 09.07.2013.

Резюме

Цель исследования – дать сравнительную характеристику показателей клеточного звена иммунной системы при специфической и комбинированной иммунотерапии больных раком шейки матки.

Обследованы 76 больных РШМ, подвергавшихся сочетанной лучевой терапии и иммунотерапии. В группе сравнения (40 пациенток) осуществлена активация лимфоцитов *in vitro* путем инкубации с опухолевым антигеном и интерлейкином-2.

В основной группе (36 больных) данный метод иммунотерапии дополнен системным применением ронколейкина и ФлогэнзимТМа. Определялись показатели клеточного иммунитета, включая содержание Т-киллеров и натуральных киллеров в периферической крови.

Полученные данные свидетельствуют о значимом по ряду показателей превышении результатов коррекции нарушений со стороны клеточного звена иммунной системы в основной группе, при сочетанной иммунотерапии. Особенно обращает на себя внимание превышение содержания клеток с киллерной активностью, обеспечивающих эффективный противоопухолевый иммунный ответ.

Ключевые слова: рак шейки матки; иммунотерапия; клеточный противоопухолевый иммунитет.

D.K. Kenbaeva

**CELLULAR IMMUNITY AT A CERVICAL CANCER:
COMPARISON OF IMMUNOTHERAPY VERSIONS***Oncologic dispensary, Astana, Kazakhstan***Abstract**

Research objective is to give the comparative characteristic of indicators of a cellular link of immune system at the specific and combined immunotherapy of patients with cervical cancer.

Are surveyed 76 patients with cervical cancer which were exposed to combined radiation therapy and an immunotherapy. Activation of lymphocytes of *in vitro* by an incubation way with a tumoral anti-gene and interleykinom-2 is carried out in the group of comparison (40 patients).

In the main group (36 patients) this method of an immunotherapy is added with system application of Ronco-leukin and Flogenzim. Indicators of cellular immunity were defined, including the maintenance of T-killers and natural killers in peripheral blood.

The obtained data testify about significant on a number of indicators excess of results of correction of violations from a cellular link of immune system in the main group, at a combined immunotherapy. Especially attracts attention excess of the maintenance of cages with the killer's activity, providing the effective antineoplastic immune reaction.

Keywords: cervical cancer; immune therapy; cell antitumor immunity.**Введение**

Иммунотерапия в течение последних тридцати лет стала неотъемлемым компонентом лечения ряда злокачественных новообразований. В то же время, весь комплекс разработанных способов и подходов до настоящего времени не обеспечивает достаточного лечебного эффекта в отношении большого числа форм новообразований [2; 8]. Лишь в минимальной степени проведены экспериментальные и клинические работы по иммунотерапии РШМ [7], а в нашей стране это направление не развивалось вовсе.

«Субъектом» иммунотерапии, проводимой в любых формах и вариантах, остаются иммунокомпетентные клетки, обладающие киллерной и хелперной активностью [1; 3]. Методы воздействия на них предусматривают активацию с помощью вак-

цин, факторов межклеточного взаимодействия, других ауто- и аллогенных стимуляторов пролиферации, дифференцировки, физических факторов и т.д. [4; 6]. Вероятно, наиболее эффективным подходом в этом плане могло бы являться использование комплекса иммуностимулирующих факторов, включающего опухолевый антиген в той или иной форме, интерлейкины, стимулирующие дифференцировку [4; 5]. Причем применение последнего подхода оправдано как при использовании версии ЛАК-терапии со стимуляцией *in vitro*, так и системным введением цитокинов.

Дополнительная активация неспецифических механизмов иммунитета, повышение доступности опухолевых антигенов за счет увеличения протеолитической активности сыворотки крови также считается перспективным и адекватным направлением в комплексной иммунотерапии.

Цель исследования – дать сравнительную характеристику показателей клеточного звена иммунной системы при специфической и сочетанной иммунотерапии больных раком шейки матки.

Материалы и методы

В клинических условиях (Региональный онкологический диспансер, г. Семей, Городской онкологический диспансер, г. Астана, Республика Казахстан) обследованы 76 больных РШМ, подвергавшихся консервативному (базисному) лечению (сочетанной лучевой терапии – СЛТ). На фоне лучевого лечения осуществлена иммунотерапия в двух вариантах. Первый (группа сравнения) предусматривал реинфузию аутолимфоцитов, подвергавшихся *in vitro* инкубации с опухолевым антигеном (гомогенат аутологичной опухолевой ткани) и интерлейкином-2. При втором варианте (основная группа) вышеуказанный метод иммунотерапии был дополнен системным применением препарата интерлейкина-2 (Ронколейкин) и средства из группы системных энзимов (ФлогэнзимTM).

Специфическую иммунотерапию осуществлялась следующим образом. У пациента проводили забор 50 мл нативной венозной крови. Для предотвращения свертывания непосредственно после взятия добавляли гепарин. Выделение лейкоцитов осуществляли из крови путем центрифугирования на градиенте фикол-верографин (плотность 1,076) раздельно в 5 пробирках по 10 мл. Полученные на градиенте лейкоциты снимали пипеткой и переносили в общую пробирку с питательной средой (раствор Хенкса или среда 199), далее повторно выделяли на аналогичном градиенте плотности в одной пробирке. Снятые с градиента плотности лейкоциты ресуспандировали в питательной среде объемом 10 мл. В среду добавляли 10000 МЕ IL-2 (ронколейкин 0,01 мг) и инкубировали в термостате при 37 °C в течение 6 ч.

Биопсийный материал злокачественного новообразования в объеме 2–3 мл разводили в 10 мл дистиллированной воды и гомогенизировали 500 Вт ультразвуковым гомогенизатором (Cole Parmer, США) в течение 15 минут, что гарантировало полное разрушение клеточных элементов при сохранении основных белковых антигенных детерминантов. Для исключения попадания неразрушенных клеток в среду инкубации и далее в организм материал подвергали фильтрации (фильтры NucleoSpin, Macherey-Nagel, Германия) с последующим осаждением на ультрацентрифуге (10000 g в течение 10 мин.).

Полученный гомогенат добавляли к инкубированным лейкоцитам в количестве 1 мл на 5 мл питательной среды с лейкоцитами и инкубировали далее 12 ч при 37 °C. Взвесь лейкоцитов после инкубации разделяли на порции по 5 мл и выделяли на градиенте фикол-верографин, трижды ресуспандировали в аналогичной питательной среде, окончательно выделяли и вводили в организм реципиента путем внутривенной инъекции.

В качестве АИТ применялся ФлогэнзимTM (по схеме: 5 таблеток 3 раза в день в течение 3 суток, 4 таблетки 3 раза в день в течение 7 суток (доза насыщения) и далее по 3 таблетки 3 раза в день до 1 месяца) и ронколейкин (в дозе 200000–250000 МЕ/кг в течение 4 недель через 2 суток внутривенно капельно в 400 мл физиологического раствора (продолжительность инфузии 4 ч) при пребывании пациентов в условиях стационара или в той же дозе подкожно в 2 мл физиологического раствора при

лечении в амбулаторных условиях). Применение методики иммунотерапии было одобрено решением этической комиссии научно-клинического отдела Государственного медицинского университета г. Семей (№76 от 20.05.2009 г.) и этического комитета АО «Медицинский университет «Астана»» (№12 от 17.03.2010 г.).

В группу сравнения были включены 40 пациенток (по 20 с IВ стадией – T₂₆N₀M₀ и III стадией – T₁₋₂N₁M₀, T₃N₀₋₁M₀), получавшие сочетанную лучевую терапию (СЛТ) и специфическую иммунотерапию (СИТ). В основную группу соответственно включены 19 и 17 больных, получавшие СЛТ, СИТ и АИТ.

Критерии включения больных в исследование:

- наличие РШМ IВ и III ст. при первичном обследовании;
- возраст от 30 до 70 лет;
- осуществление хирургического лечения и/или сочетанной лучевой терапии в качестве основного лечения;
- наличие информированного согласия пациенток на проведение комбинированного лечения, включающего специфическую иммунотерапию и иммуномодулирующую терапию, а также на анонимное использование полученных данных в рамках научного исследования.

Критерии исключения:

- отсутствие информированного согласия пациентки или отказ от участия в исследовании на любом этапе кроме последнего (обобщение обработанной информации);
- наличие тяжелых сопутствующих соматических и системных заболеваний;
- летальный исход до завершения курса лечения.

Определяли число общих Т-лимфоцитов и в зависимости от кластеров дифференцировки: CD3⁺ зрелые Т-лимфоциты (Beckman Coulter, №A07746); CD3⁺CD4⁺ Т-хелперы (Beckman Coulter, №A07750); CD3⁺CD56⁺CD16⁺ натуральные киллеры (Beckman Coulter, №A07735); CD3⁺CD56⁺CD16⁺ Т-киллеры (Beckman Coulter, №A07415) методом ИФА на проточном цитометре Beckman Coulter.

При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Сравнение количественных признаков проводилось с помощью критерия Стьюдента. Ограничения использования данного метода включали анализ распределения по критерию Колмогорова-Смирнова, а также несоблюдение равенства дисперсий числовых рядов.

При несоблюдении критериев применимости параметрических методов использован непараметрический метод анализа в независимых выборках по критерию Манна-Уитни. Граничным уровнем статистической значимости различий принимался p<0,05.

Результаты и обсуждение

Основные результаты иммунотерапии в настоящем исследовании представлены в табл. 1–2.

В основной группе и группе сравнения не было существенных различий показателей содержания общих лимфоцитов. Аналогично, не было существенных различий с контрольной группой по абсолютному содержанию в крови CD3⁺ клеток, причём данный показатель был выше в основной группе, чем в группе сравнения на 20,2 % (p<0,05).

Таблица 1

Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ IIВ ст. при проведении иммунотерапии

Показатели	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ IIВ ст.	
		группа сравнения, n=20	основная группа, n=19
Лимфоциты общ., $\times 10^9/\text{л}$	2,10 \pm 0,09	1,93 \pm 0,09	2,12 \pm 0,09
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	1,45 \pm 0,06	1,14 \pm 0,05*	1,37 \pm 0,06**
CD3+,%	69,0 \pm 2,4	59,1 \pm 2,3*	64,6 \pm 2,5
CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,89 \pm 0,05	0,81 \pm 0,05	0,94 \pm 0,05
CD3+CD4+,%	42,4 \pm 1,9	42,0 \pm 2,1	44,3 \pm 2,1
CD3-CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,17 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01* **
CD3-CD56+CD16+,%	8,1 \pm 0,5	7,8 \pm 0,5	9,4 \pm 0,5
CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,11 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01*	0,10 \pm 0,01**
CD3+CD56+CD16+,%	5,3 \pm 0,4	3,7 \pm 0,3*	4,7 \pm 0,3**

*различия с показателем контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$;
**различия с показателем группы сравнения статистически значимы, $p < 0,05$.

Таблица 2

Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ III ст. при проведении иммунотерапии

Показатели	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ III ст.	
		группа сравнения, n=20	основная группа, n=17
Лимфоциты общ., $\times 10^9/\text{л}$	2,10 \pm 0,09	1,57 \pm 0,09*	1,95 \pm 0,09***
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	1,45 \pm 0,06	1,08 \pm 0,06*	1,41 \pm 0,06***
CD3+,%	69,0 \pm 2,4	68,8 \pm 3,1	72,3 \pm 2,9
CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,89 \pm 0,05	0,73 \pm 0,05*	0,88 \pm 0,05***
CD3+CD4+,%	42,4 \pm 1,9	46,5 \pm 2,7	45,1 \pm 2,4
CD3-CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,17 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01**	0,15 \pm 0,01***
CD3-CD56+CD16+,%	8,1 \pm 0,5	6,4 \pm 0,5*	7,7 \pm 0,4
CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,11 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01*	0,10 \pm 0,01***
CD3+CD56+CD16+,%	5,3 \pm 0,4	3,9 \pm 0,2*	5,1 \pm 0,3***

*различия с показателем контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$;
** различия с показателем контрольной группы статистически значимы, $p < 0,01$;
***различия с показателем группы сравнения статистически значимы, $p < 0,05$.

Таблица 3

Анализ 3-летней выживаемости больных обследованных групп в зависимости от проведенного лечения

РШМ IIВ ст.	СЛТ + СИТ, n=20	17	85,0 %
	СЛТ + СИТ + АИТ, n=19	18	94,7 %
РШМ III ст.	СЛТ + СИТ, n=20	15	75,0 %
	СЛТ + СИТ + АИТ, n=17	15	88,2 %

По относительному содержанию CD3⁺ клеток значимых различий между группами не было. Абсолютное число и относительное содержание CD3⁺CD4⁺ клеток в группе СИТ+АИТ незначимо превысило как показатели группы СИТ, так и контрольные значения.

Было выявлено значимое превышение содержания натуральных киллеров над значениями полученными в группе СЛТ+СИТ – на 33,3 % и 20,9 % соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях).

Полностью нормализовалось также абсолютное и практически полностью – относительное содержание Т-киллеров за счёт превышения над показателями группы СИТ на 42,9 и 27,5 % соответственно ($p < 0,05$ также в обоих случаях).

Содержание общих лимфоцитов в крови больных основной группы не имело значимых различий с контролем и на 24,2 % превышало показатель группы сравнения ($p < 0,05$).

Имелось также значимое превышение числа CD3⁺ над показателем группы сравнения (на 30,6 %, $p < 0,05$). По относительной величине их содержания различий между группами не было.

В результате проведения сочетанной иммунотерапии наблюдалась полная нормализация содержания в крови Т-лимфоцитов-хелперов.

Превышение над группой сравнения по абсолютному показателю было статистически значимым и составило 20,9 % ($p < 0,05$).

Более выраженное, чем в крови больных группы РШМ IIВ ст., снижение абсолютного и относительного числа натуральных киллеров дало более значительное различие по данному показателю между группами обследованных женщин.

Так, степень превышения по абсолютной величине составила 49,7 % ($p < 0,05$), значимых различий с контролем не наблюдалось. По относительному содержанию CD3⁺CD56⁺CD16⁺ клеток превышение над группой сравнения составило 20,2 % ($p > 0,05$).

Как по абсолютному, так и по относительному содержанию CD3⁺CD56⁺CD16⁺ клеток в основной группе не было различий с контролем и наблюдалось значимое превышение над группой сравнения (на 66,7 и 31,5 %, $p < 0,05$ в обоих случаях).

В табл. 3 представлены данные о 3-летней выживаемости обследованных больных в целом по всем группам в зависимости от стадии и проведенного лечения. Анализ показал наличие её зависимости от проводимой терапии.

Имело место превышение 3-летней выживаемости по отношению к группе сравнения при IIВ стадии на 9,7 %, при III стадии – на 13,2 %.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значимом по ряду показателей превышении результатов коррекции нарушений со стороны клеточного звена иммунной системы в основной группе, при сочетанной иммунотерапии.

Особенно обращает на себя внимание повышение содержания клеток с киллерной активностью, обеспечивающих эффективный противоопухолевый иммунный ответ. В целом проведенный анализ наиболее четко свидетельствует о клинической эффективности применения методов специ-

фической и адоптивной иммунотерапии у больных раком шейки матки, что выразилось в увеличении степени лучевого патоморфоза, уменьшении постлучевых реакций и осложнений, улучшении качества жизни, повышении 3- и 5-летней выживаемости.

Литература

1. *Hamdy S., Haddadi A., Ghotbi Z. et al.* Part I: targeted particles for cancer immunotherapy // *Curr Drug Deliv.* – 2011. – 8(3). – P. 261–73.
2. *Harada Y., Yonemitsu Y.* New technologies for immunotherapy against cancer: development of cell expansion technology and viruses as immune boosters // *Yakugaku Zasshi.* – 2010. – 130(11). – P. 1519–26.
3. *Iga-Murahashi M., Hijikata Y., Suehiro Y. et al.* New strategies in anti-tumor immunotherapy // *Rinsho Ketsueki.* – 2010. – 51(11). – P. 1654–60.
4. *O'Neill D.W.* Dendritic cells and T cells in immunotherapy // *J Drugs Dermatol.* – 2010. – 9(11). – P. 1383–92.
5. *Onishi H., Suzuki H., Chikazawa N. et al.* New immunotherapy against cancer: a therapy to control regulatory T cell // *Fukuoka Igaku Zasshi.* – 2010. – 101(10). – P. 207–14.
6. *Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J.* Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion // *Science.* – 2011. – 331(6024). – P. 1565–70.
7. *Su J.H., Wu A., Scotney E. et al.* Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential // *BioDrugs.* – 2010. – 24(2). – P. 109–29.
8. *Yaguchi T., Sumimoto H., Kudo-Saito C. et al.* The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies // *Int J Hematol.* – 2011. – 93(3). – P. 294–300.

СПИСОК ИСПОЛЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АИТ	– адоптивная иммунотерапия
РШМ	– рак шейки матки

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

