

На правах рукописи

СЕЛИХОВА Юлия Борисовна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОЙ И КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМ У
БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

14 00 36 – аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук



Новосибирск – 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

академик РАМН,
профессор,
доктор медицинских наук

Козлов Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

профессор,
доктор медицинских наук

Климов Владимир Васильевич
ГУ ВПО «Сибирский
государственный медицинский
университет Федерального агентства
по здравоохранению и социальному
развитию», г Томск

доктор медицинских наук

Колесников Анатолий Петрович
ГУ НИИ клинической и
экспериментальной лимфологии СО
РАМН, г Новосибирск

Ведущая организация.

ГУ Научно-исследовательский институт онкологии Томского научного центра СО РАМН, г Томск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2008 г в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001 001 01 при Государственном учреждении Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (630099, Новосибирск, ул Ядринцевская, 14)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (630099, Новосибирск, ул Ядринцевская, 14)

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук**

О Т Кудалева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Экологическая и социально-экономическая обстановка в мире обусловила интенсивный рост частоты злокачественных новообразований. Основной причиной онкологической заболеваемости и смертности среди женщин является рак молочной железы (РМЖ). Наблюдается заметное «омоложение» РМЖ - в настоящее время молодые женщины (до 40 лет) болеют вдвое чаще, чем 30 лет назад. Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении РМЖ, последние три десятилетия отмечается неуклонный рост заболеваемости этой патологией, преимущественно в развитых странах. Так, по данным ВОЗ каждый год в мире регистрируется около 1 млн новых случаев РМЖ, в странах СНГ – свыше 50 тысяч. Эта патология развивается у каждой восьмой женщины в США, и у каждой десятой женщины в странах Европы [Stewart B et al, 2003, Зотов А С и др, 2005, Couzin J, 2005, Imai H et al, 2007].

В большинстве случаев при РМЖ II-III стадий проводится комплексная противоопухолевая терапия [Летягин В П, 2004, Зотов А С и др, 2005, Переводчикова Н И, 2007]. Такой подход позволяет добиться ремиссии, продлить жизнь больных. Но объемные хирургические операции, лучевая терапия и цитостатическая химиотерапия (ХТ), приводят к дополнительным нарушениям функций исходно компрометированной иммунной системы. Возможности ХТ лимитируются выраженными побочными эффектами цитостатических препаратов и в первую очередь - токсическим действием в отношении систем крови и иммунитета. Во время противоопухолевого лечения у онкологических пациентов наблюдается иммунодепрессия, имеющая несколько составляющих: предшествующий онкогенезу дефект функции иммунного надзора, опухоль-индуцированная и ятрогенная супрессия иммунитета [Бережная Н М и др, 2000, Козлов В А и др, 2004, Новиков В И и др, 2006]. В этих условиях возрастает риск развития вторичных инфекций, аутоиммунных реакций, вторичных онкозаболеваний, а также рецидива/метастазирования опухоли за счет ослабления механизмов иммунного надзора. Вышесказанное обосновывает иммунотерапию как важную составляющую комплексного лечения злокачественных опухолей.

Сегодня наилучшие результаты неспецифической иммунотерапии в онкологии достигнуты при применении препаратов цитокинов и их аналогов. В связи с чем, в попытке создать лекарственный комплекс из естественных для человека основных иммунорегуляторных пептидов, для иммунореабилитации была выбрана комбинация, включающая ронколейкин, тимоген и лейкинферон. Такое сочетание препаратов у больных РМЖ применяется впервые, хотя существуют данные об успешном изолированном применении каждого из них при этой патологии [Кузнецов В П, 2000, Чистяков С С и др, 1995, Молчанов О Е, 2005, Попович А М, 2002, Мирошник О А, 2006].

Выявление механизмов и сроков развития нарушений иммуногемопоза у больных РМЖ при проведении противоопухолевого лечения позволит проводить более успешный поиск и разработку новых подходов по профилактике и коррекции иммунных нарушений с целью повышения эффективности традиционной терапии и улучшения качества жизни пациентов.

Цель исследования. Изучить особенности нарушений иммунной и кроветворной систем, механизмы иммунной реконституции и возможности

иммунореабилитации у больных РМЖ при проведении комплексной противоопухолевой терапии

Задачи исследования:

- 1 Изучить показатели периферической крови и параметры иммунитета (включая оценку продукции факторов гемоиммуопозза, про- и противовоспалительных цитокинов клетками периферической крови) у больных РМЖ на этапе завершения лучевой терапии и хирургического лечения до начала ХТ
- 2 Охарактеризовать показатели иммунитета и кроветворения у больных РМЖ после проведения адьювантной ХТ (в том числе в зависимости от применения препарата ДНК – дерината) и проанализировать взаимосвязь показателей иммунитета с развитием инфекционных осложнений
- 3 Исследовать состояние иммунитета и кроветворения у больных РМЖ в восстановительном периоде (через 3 месяца) после завершения ХТ
- 4 Оценить влияние комбинированной иммунотерапии (ронколейкин, тимоген и лейкинферон), проводимой после завершения комплексного лечения РМЖ (восстановительный период) на показатели гемоиммуопозза и выживаемости больных

Научная новизна. Впервые получены новые данные о динамике развития нарушений гемоиммуопозза у больных РМЖ на разных этапах комплексного противоопухолевого лечения. Установлено, что уже до начала ХТ – после лучевой терапии и хирургического лечения – развиваются цитопения и иммунодепрессия, которые усугубляются в процессе проведения последующей ХТ. Впервые охарактеризовано влияние противоопухолевой терапии на цитокин-продуцирующую функцию клеток крови. Показано, что после радиотерапии/хирургического лечения у больных выявляется усиление продукции ростовых кроветворных факторов (G-CSF, IL-17) и хемокинов (MCP-1, MIP-1 β), возрастание индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-12, IL-17) и снижение уровня IL-13. При этом ХТ приводит к дальнейшему усилению спонтанной продукции G-CSF и ослаблению продукции цитокинов/хемокинов с провоспалительной активностью (MIP-1 β , IL-12, IL-17). Получены новые данные, косвенно свидетельствующие о включении механизмов гомеостатической пролиферации уже на ранних этапах противоопухолевого лечения, предшествующих ХТ.

Установлена взаимосвязь частоты инфекционных осложнений ХТ с изменением продукции цитокинов. Показано, что иммунотерапия препаратом ДНК (деринат), проводимая одновременно с ХТ, сопровождается снижением содержания эритроцитов, нарастанием частоты инфекционных осложнений и не способствует улучшению показателей иммунитета в раннем восстановительном периоде. В то же время короткий курс комбинации иммуностимуляторов (ронколейкин, лейкинферон, тимоген) после окончания противоопухолевого лечения характеризуется противовоспалительным эффектом и улучшает показатели крови.

Теоретическая и практическая значимость. Проведенные исследования расширяют представления о характере и динамике нарушений кроветворения и иммунной системы в процессе проведения комплексного противоопухолевого лечения у больных РМЖ и являются обоснованием для назначения иммунокорректирующей терапии. При этом полученные результаты свидетельствуют, что иммунотерапия является эффективной, когда проводится в виде короткого курса

комбинации иммуномодуляторов после завершения ХТ В то же время часто назначаемый во время ХТ препарат ДНК не позволяет добиться коррекции иммунных дисфункций у больных РМЖ и приводит к углублению анемии и более частому развитию инфекционных осложнений

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1 Нарушения гомеоиммунопоза являются ранним осложнением комплексного противоопухолевого лечения больных РМЖ, развиваются к моменту завершения радиотерапии и хирургического лечения (до начала ХТ) и характеризуются рядом признаков, характерных для включения гомеостатической пролиферации
- 2 Короткий курс иммунотерапии в виде комбинации иммуностропных препаратов (ронколейкин, лейкинферон, тимоген) у больных РМЖ является эффективным на этапе завершения комплексного лечения, тогда как проведение иммунокоррекции препаратом ДНК (деринат) во время адьювантной ХТ приводит к усилению выраженности анемии и повышению частоты развития инфекционных осложнений

Апробация результатов. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 1) врачебных научно-практических конференциях (Новосибирск, 2006г), 2) научной отчетной сессии ГУ НИИ клинической иммунологии СОРАМН (Новосибирск, 2006г), 3) V международном конгрессе по иммунопатологии (Москва, 2007г), 4) научном семинаре ГУ НИИ клинической иммунологии СОРАМН (Новосибирск, 2008г)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 1 статья - в журнале, рекомендованном ВАК для публикации результатов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Объем и структура диссертации. Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Материал изложен на 118 страницах, включает 24 таблицы и 4 рисунка. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 194 литературных источника, в том числе 123 иностранных

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Общая характеристика больных. Работа основана на результатах обследования 50 пациентов и 50 здоровых доноров. Все пациенты – женщины, больные РМЖ II и III стадий ($T_{2,4} N_{0,2} M_0$), проходившие стационарное обследование и лечение в МУЗ ГКБ №1 г.Новосибирска. Иммунологическое обследование и иммунотерапия проводились в иммунологическом отделении клиники ГУ НИИ КИ СОРАМН. Возраст пациентов - от 32 до 68 лет. Все пациенты получали стандартное комплексное противоопухолевое лечение: 1) предоперационную лучевую терапию, 22-26 сеансов, 2) через 1 месяц - хирургическое лечение (радикальная односторонняя мастэктомия по Маддену), 3) через 20 дней - ХТ по схеме АС (доксорубин $60\text{мг}/\text{м}^2$ и циклофосфамид $600\text{мг}/\text{м}^2$, введение 1раз в 21день, всего 4 курса). Группу контроля составили здоровые доноры у 50 человек (возраст от 20 до 65 лет) проводился общий анализ крови и

оценка иммунограммы, у 13 человек (возраст от 32 до 67 лет) – определение продукции 9 цитокинов

Обследование пациентов проводилось в 3 этапа 1) через 15-20 дней после хирургического лечения (до начала ХТ), на момент обследования у всех пациентов были удалены послеоперационные дренажи, и констатировалось заживление послеоперационного шва, n=50, 2) через 1 месяц после окончания ХТ, n=35, 3) через 3 месяца после окончания ХТ, n=35

У всех пациентов проводился общий анализ крови и оценка иммунного статуса (количество CD3+, CD4+, CD8+, CD16+ и CD19+ лимфоцитов, эффекторные функции лимфоцитов, функциональная активность фагоцитарных клеток) У части пациентов (1-й этап - n=13, 2-й этап - n=13, 3-й этап - n=14) оценивалась продукция 9 цитокинов - IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-12 (p 70), IL-13, IL-17, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β

14 отобранных случайным образом пациентов через 1 месяц после окончания ХТ, после 2-го этапа обследования, получали 10-дневный курс иммунореабилитации. Период после окончания противоопухолевого лечения, когда достигается минимум опухолевой нагрузки в организме пациента, является наиболее благоприятным и безопасным для проведения иммунотерапии. Выбор препаратов основывался на литературных данных о стимулирующем влиянии каждого из них на гемопоэз, функциональную активность иммунокомпетентных клеток и противоопухолевый иммунитет. В иммунотерапии была использована комбинация из трех иммуностимуляторов (Ронколейкин 250тыс ед подкожно через день №5, Лейкинферон 1ампула/10000МЕ человеческого ИФН- α / внутримышечно через день №5, Тимоген 1мл /100мкг/ внутримышечно 1 раз в день ежедневно №10). Ронколейкин – рекомбинантный IL-2, продуцируемый клетками пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которых встроены ген IL-2 человека. Лейкинферон – комплекс цитокинов (IFN- α , IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , MIF и LIF), продуцируемых лейкоцитами крови здоровых доноров под воздействием вируса Тимоген – синтетический аналог тимического пептида (глутамил-триптофана моносодриевая соль моногидрат).

Методы оценки клеточного состава периферической крови и состояния иммунитета.

Общий анализ периферической крови проводился на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария-Италия)

Общее количество лимфоцитов и их субпопуляций определяли с помощью проточного цитометра FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) в программе CellQuest^{Pro} (Becton Dickinson, USA), используя параметры светорассеяния, в соответствии с инструкциями производителя. Поверхностные маркеры лимфоцитов выявляли с помощью меченных моноклональных антител против CD3, CD4, CD8, CD16, CD19

Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активации нейтрофилов (ПАН) и моноцитов (ПАМ), определяемым по продукции перекиси водорода клетками после инкубации с опсонизированным зимозаном (опыт) и раствором Хенкса (контроль). Результат оценивался на анализаторе (Multiskan MS, Labsystems, Финляндия) по интенсивности окрашивания пробы (учитывали оптическую плотность - ОП), которое происходило за счет окисления ортофенилдиамина (ОФД) в процессе катаболизма перекиси водорода. Стимуляцию

продукции перекиси водорода выражали как ПАН в пробах с лейкоцитами и ПАМ в пробах с мононуклеарами в виде частного от деления ОП в опыте на ОП в контроле

Также активность гранулоцитов и моноцитов (фагоцитоз) оценивалась методом проточной цитометрии после инкубации выделенных клеток с латексом, нагруженным гамма-глобулином (Биопрепарат, Санкт-Петербург) и меченым ФИТЦ. По количеству поглощенных одной клеткой тест-частиц определялось количество фагоцитирующих клеток и интенсивность фагоцитоза

Оценку активности клеточных эффекторных функций [Лозовой В П, Кожевников В С, 1990] проводили с помощью трех показателей, вычисляемых с использованием полученного в лунках количества клеток (использовали среднее значение результатов двух однотипных лунок – дублей) индекса миграции (ИМ), индекса ингибции миграции (ИИМ) и показателя эффекторных функций (ПЭФ). ИМ представляет собой частное от деления количества клеток в опыте 1 (с низкой дозой ФГА, стимулирующей миграцию гранулоцитов и моноцитов) на таковое в контроле и характеризует подвижность клеток в ответ на стимул ИИМ равен частному от деления количества клеток в опыте 2 (с оптимальной дозой ФГА, стимулирующей продукцию лимфоцитами факторов ингибции миграции) на таковое в контроле и характеризует потенциальную активность лимфоцитов – продуцентов факторов ингибции миграции (эффекторов гиперчувствительности замедленного типа). ПЭФ – интегральный показатель активности ГЗТ-эффекторов (лимфоцитов и гранулоцитов с моноцитами), представляющий собой частное от деления ИМ на ИИМ

Содержание в супернатантах цельной крови 9 цитокинов (IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-12 (p 70), IL-13, IL-17, GCSF, MCP-1, MIP-1 β) оценивали методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (определяемый динамический диапазон 2-32000 пкг/мл) 1 мл цельной гепаринизированной крови смешивали с 4 мл среды RPMI-1640 (Sigma, USA), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, т.е. кровь разводили в 5 раз. Подготовленные таким образом образцы крови (по 1 мл) культивировали в круглодонных стерильных пробирках в присутствии липополисахарида (ЛПС, Escherichia coli 0111 B4 (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл), а также в отсутствие митогенной стимуляции. Культивирование проводили при 37 °С в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч, после чего отбирали супернатанты и хранили полученные образцы при -20 °С до тестирования. Анализ содержания цитокинов проводили тремя независимыми экспериментальными сериями. Уровень продукции цитокинов в цельной крови пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества мононуклеарных клеток (МНК) и выражали в пкг/мл/10⁶ МНК

Методы статистической обработки полученных результатов Для математической обработки полученных данных использовалась статистическая компьютерная программа STATISTICA 6.0 for Windows (StatSoft, USA)

Характеристика иммунной системы и кроветворения у больных РМЖ после лучевой терапии и хирургического лечения до начала ХТ

Анализ средних значений показателей эритропоэза у больных РМЖ после хирургического лечения выявил по сравнению со здоровыми донорами достоверное снижение содержания эритроцитов и гемоглобина (табл 1) Лабораторные признаки анемии (эритроциты $<3,9 \times 10^{12}/л$ и гемоглобин $<120 г/л$) у больных РМЖ наблюдались с частотой 40% и 26% соответственно У больных также отмечалось достоверное снижение абсолютного содержания лимфоцитов при отсутствии значимых изменений уровня лейкоцитов, нейтрофилов и моноцитов Соответственно, лимфопения ($<1,2 \times 10^9/л$) регистрировалась у большинства пациентов - в 68% случаев, тогда как лейкопения ($<4,0 \times 10^9/л$) выявлялась только в 26% случаев, а нейтропения ($<2,0 \times 10^9/л$) еще реже - в 8% случаев

Выявленная лимфопения обуславливалась снижением абсолютного количества всех исследуемых субпопуляций лимфоцитов $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Т-лимфоцитов, $CD19^+$ В-лимфоцитов, $CD16^+$ НК-клеток (табл 2) У больных регистрировалось снижение относительного количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов и увеличение $CD8^+$ Т-клеток, что приводило к уменьшению ИРИ Также отмечался дефицит относительного содержания в крови $CD19^+$ В-лимфоцитов

При анализе моноцитарного звена иммунитета у больных отмечалось достоверное снижение количества моноцитов, способных фагоцитировать FITS-меченные латексные частицы, и недостоверное - ПАМ, исследуемого по продукции метаболитов кислорода (H_2O_2) в ответ на стимуляцию зимозаном Снижение фагоцитарной активности было также характерно и для нейтрофилов, тем не менее, данная фракция клеток сохраняла способность к продукции H_2O_2 в стимулированных культурах, среднее значение ПАИ регистрировалось даже выше уровня доноров

Лабораторные признаки иммунодефицитного состояния были выявлены у подавляющего большинства больных РМЖ - в 84% случаев (42/50) Среди них комбинированные нарушения, затрагивающие два и более звена иммунитета, регистрировались более чем у половины больных - в 66% случаев, в то время как изолированные расстройства с поражением одного звена иммунитета встречались в 34% случаев При этом в структуре иммунных нарушений изменения Т-клеточного и моноцитарного звеньев регистрировались значительно чаще (89% и 79%), чем изменения нейтрофилов и В-клеток (31% и 29%)

Результаты исследования продукции цитокинов показывают, что даже в условиях спонтанного культивирования клетки цельной крови больных РМЖ активно секретируют хемокины и ростовые факторы По сравнению с донорами у больных РМЖ после хирургического лечения регистрируется (табл 3) достоверное увеличение спонтанной продукции факторов гемоиммунопоэза (G-CSF, IL-7) и, особенно, хемокинов (MCP-1, MIP-1 β), а также достоверное повышение уровня митоген-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-12, IL-17), ростового фактора IL-7 и хемокинов (MCP-1, MIP-1 β) Интенсивность спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции IL-13, относящегося к группе Th2/противовоспалительных цитокинов, оказалась существенно снижена Продукция IL-5 оставалась на уровне нижних пороговых значений

Таблица 1

Сравнительная характеристика гематологических показателей у больных РМЖ и здоровых доноров, $M \pm s e$

Параметры	Доноры (n=50)	Больные после хир лечения, n=50	Больные через 1мес после ХТ, n=35	Больные через 3мес после ХТ, n=35	Больные через 3 мес после ХТ, ИТ/-, n=21	Больные через 3 мес после ХТ, ИТ/+, n=14
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	$5,1 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,2^{**\wedge}$	$4,66 \pm 0,25$	$4,5 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,4$
Нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	$2,8 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2^\wedge$	$2,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$
Лимфоциты ПК ($\times 10^9/\text{л}$)	$1,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1^{**}$	$0,9 \pm 0,1^{**}$	$1,2 \pm 0,1^{**\wedge\wedge}$	$1,2 \pm 0,1^{**}$	$1,2 \pm 0,1^{**}$
Моноциты ($\times 10^9/\text{л}$)	$0,3 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0$	$0,3 \pm 0$	$0,4 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0$	$0,4 \pm 0$
Эритроциты ($\times 10^{12}/\text{л}$)	$4,7 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1^{**}$	$4,0 \pm 0,1^{**}$	$4,3 \pm 0,1^{**}$	$4,1 \pm 0,1^{**}$	$4,4 \pm 0,1^\wedge$
Гемоглобин (г/л)	$145,5 \pm 3,3$	$126,0 \pm 1,7^{**}$	$126,7 \pm 1,9^{**}$	$133,7 \pm 2,0^{**\wedge}$	$130,4 \pm 2,1^{**}$	$138,6 \pm 3,5$
СОЭ (мм/ч)	$11,4 \pm 1,6$	$35,8 \pm 1,7$	$22,3 \pm 1,6^\wedge$	$19,3 \pm 1,3^{**\wedge}$	$20,0 \pm 1,9$	$18,2 \pm 1,4$

Примечание ** - $P < 0,01$ - достоверность различий между больными РМЖ и донорами, достоверность различий 1) между больными после хир лечения и через 1 месяц после ХТ, 2) больными через 1 месяц и 3 месяца после ХТ, 3) больными ИТ /+ и ИТ /- (U- критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Таблица 2

Сравнительная характеристика показателей иммунитета у больных РМЖ и здоровых доноров, $M \pm s e$

Параметры	Доноры (n=50)	Больные после хир лечения (n=50)	Больные через 1 мес после ХТ (n=35)	Больные через 3 мес после ХТ, n=35	Больные через 3 мес после ХТ, ИТ (-), n=21	Больные через 3 мес после ХТ, ИТ (+), n=14
Лимфоциты ВК ($\times 10^9/\text{л}$)	1,98 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1**	0,88 \pm 0,06**	1,17 \pm 0,1**^	1,22 \pm 0,2**	1,1 \pm 0,09**
CD3 ⁺ Т-кл (%)	63,68 \pm 1,5	61,1 \pm 1,3	58,4 \pm 1,7*	55,1 \pm 1,6**	56,43 \pm 1,8**	53,14 \pm 2,9**
CD3 ⁺ Т-кл ($\times 10^9/\text{л}$)	1,25 \pm 0,1	0,6 \pm 0,03 **	0,51 \pm 0,04**	0,61 \pm 0,06**	0,68 \pm 0,1**	0,58 \pm 0,05**
CD4 ⁺ Т-кл (%)	36,98 \pm 1,1	31,3 \pm 1,2**	31,9 \pm 1,5**	28,2 \pm 1,2**^	28,0 \pm 1,6**	28,42 \pm 1,8**
CD4 ⁺ Т-кл ($\times 10^9/\text{л}$)	0,72 \pm 0,05	0,3 \pm 0,02 **	0,28 \pm 0,02**	0,32 \pm 0,03**	0,33 \pm 0,04**	0,32 \pm 0,03**
CD8 ⁺ Т-кл (%)	24,04 \pm 1,1	29,2 \pm 1,2**	26,8 \pm 1,5	27,9 \pm 1,1**	28,9 \pm 1,3**	26,42 \pm 2,1
CD8 ⁺ Т-кл ($\times 10^9/\text{л}$)	0,47 \pm 0,03	0,3 \pm 0,02 **	0,23 \pm 0,02**^	0,33 \pm 0,03**^	0,35 \pm 0,05*	0,29 \pm 0,03**
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,74 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1**	1,35 \pm 0,1*	1,06 \pm 0,06**	1,01 \pm 0,08**	1,16 \pm 0,1**
CD19 ⁺ В-кл (%)	11,14 \pm 0,5	7,6 \pm 0,6**	8,5 \pm 0,8*	12,6 \pm 1,0^^	12,85 \pm 1,2	12,29 \pm 1,8
CD19 ⁺ В-кл ($\times 10^9/\text{л}$)	0,22 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01 **	0,08 \pm 0,01**	0,14 \pm 0,01**^^	0,15 \pm 0,02*	0,13 \pm 0,2**
CD16 ⁺ НК-кл (%)	19,2 \pm 1,2	21,9 \pm 1,3	22,7 \pm 1,8	22,42 \pm 1,44	22,0 \pm 1,7	23,07 \pm 2,7
CD16 ⁺ НК-кл ($\times 10^9/\text{л}$)	0,38 \pm 0,03	0,2 \pm 0,02**	0,2 \pm 0,02**	0,27 \pm 0,04**	0,29 \pm 0,06*	0,27 \pm 0,05*
Фагоцитоз гранулоцит (%)	82,0 \pm 1,4	66,9 \pm 1,2**	71,3 \pm 2,1**^	70,2 \pm 1,6**	71,35 \pm 1,4**	68,71 \pm 3,4**
Фагоцитоз моноцитов (%)	69,9 \pm 1,3	56,5 \pm 1,3**	58,91 \pm 2,1**	62,5 \pm 1,4**	62,65 \pm 1,5**	62,5 \pm 2,9*
ИМ (усл ед)	1,3 \pm 0,09	1,2 \pm 0,1	0,93 \pm 0,06*	1,01 \pm 0,06**	0,99 \pm 0,08*	1,05 \pm 0,1
ИИМ (усл ед)	0,5 \pm 0,04	0,4 \pm 0,1*	0,31 \pm 0,02**	0,31 \pm 0,05**	0,36 \pm 0,08**	0,24 \pm 0,03**
ПЭФ (усл ед)	3,4 \pm 0,4	3,7 \pm 0,3	3,5 \pm 0,3	4,82 \pm 0,44**^	4,58 \pm 0,6*	5,20 \pm 0,6**
ПАМ (усл ед)	2,8 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1**	1,94 \pm 0,08**	2,04 \pm 0,1	1,76 \pm 0,1**
ПАН (усл ед)	2,6 \pm 0,2	4,6 \pm 0,3**	4,8 \pm 0,5**	4,26 \pm 0,32**	4,37 \pm 0,4**	4,04 \pm 0,7

Примечание ** - $P < 0,01$ - достоверность различий между больными РМЖ и донорами, достоверность различий 1) между больными после хир лечения и через 1 месяц после ХТ, 2) больными через 1 месяц и 3 месяца после ХТ (U- критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Таблица 3

Сравнительная характеристика спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов (пкг/мл/10⁶МНК) клетками крови больных РМЖ и здоровых доноров

Цитокины	Доноры, n=13		Больные после хир лечения, n=13		Больные через 1 мес после ХТ, n=13	
	0 (M ± se)	ЛПС (M ± se)	0 (M ± se)	ЛПС (M ± se)	0 (M ± se)	ЛПС (M ± se)
IL-1β	73,8 ± 26,2	1183 ± 236	41,6 ± 8,7	21194 ± 9620 *	43,7 ± 24,9 *	23759 ± 11930
IL-12	27,1 ± 12,3	38,1 ± 12,0	17,8 ± 2,9	75,6 ± 13,7 *	15,4 ± 1,9	52,8 ± 8,0
IL-17	122 ± 34	106 ± 6,3	73,3 ± 13,8	302 ± 51 *	32,8 ± 9,8 ***^	283 ± 57 *
IL-5	3,0 ± 0,2	3,4 ± 0,3	4,8 ± 0,6	4,8 ± 0,7	4,7 ± 0,5 **	4,7 ± 0,5 *
IL-13	23,0 ± 5,2	30,2 ± 4,6	4,1 ± 0,8 **	12,5 ± 2,3 **	4,2 ± 0,8 **	11,8 ± 3,2 *
IL-7	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5	21,3 ± 3,3 **	26,8 ± 3,8 **	19,3 ± 2,0 **	24,1 ± 2,2 *
G-CSF	148 ± 67	2717 ± 605	247 ± 37 **	6925 ± 1857	1187 ± 1040^	7263 ± 3735
MCP-1	1290 ± 534	2029 ± 665	22684 ± 5579 **	12091 ± 2036 **	8371 ± 3808^^	8064 ± 1316 **
MIP-1β	1278 ± 196	1780 ± 294	116170 ± 13701 **	115529 ± 19504 **	90095 ± 13143 **	127210 ± 12935 **

Продолжение табл 3

Цитокины	Больные через 3 мес после ХТ, n=14		Больные через 3мес после ХТ, ИТ/-, n=5		Больные через 3 мес после ХТ, ИТ/+, n=9	
	0 (M ± se)	ЛПС (M ± se)	0 (M ± se)	ЛПС (M ± se)	0 (M ± se)	ЛПС (M ± se)
IL-1β	5,5 ± 1,6***^	6054,7 ± 5301,1	4,0 ± 0,6 **	16222 ± 14678	6,2 ± 2,4 **	406 ± 135 *
IL-12	7,4 ± 1,0^^	30,4 ± 5,0^	7,4 ± 1,2	26,6 ± 2,5	7,3 ± 1,5	32,6 ± 7,7
IL-17	8,9 ± 3,5***^	145,6 ± 19,3^	4,0 ± 0,6 **	166,7 ± 40,2	11,6 ± 5,4 **	133 ± 21,1
IL-5	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,6	4,0 ± 0,6	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5
IL-13	3,5 ± 0,5**	5,4 ± 1,4***^	3,5 ± 0,8 **	8,8 ± 3,3 **	3,3 ± 0,6 **	3,6 ± 0,7 **
IL-7	15,1 ± 1,5**	17,1 ± 1,6***^^	15,1 ± 1,8 **	17,2 ± 1,1 ***^	15,1 ± 2,2 **	17,0 ± 2,5 **
G-CSF	73,8 ± 14,6^	3316,1 ± 1145,4	53,4 ± 14,8	5351 ± 2991	85,2 ± 20,9	2185 ± 619
MCP-1	3369 ± 1470	9707 ± 2727**	4655 ± 2909	4616 ± 2033	2655 ± 1713	12536 ± 3853 **
MIP-1β	31271 ± 9703***^^	99003 ± 11035**	36590 ± 22415 **	107576 ± 15354 **	28316 ± 9767 *	94240 ± 15310 **

Примечание * - p_U < 0,05, ** - p_U < 0,01 - достоверность различий по сравнению с донорами, ^ - p_U < 0,05, ^^ - p_U < 0,01 – достоверность различий 1) между больными после хир лечения и через 1 месяц после ХТ, 2) больными через 1 месяц и 3 месяца после ХТ, 3) больными ИТ /+ / и ИТ /- / (U- критерий Вилкоксона-Манна-Уитни)

Наблюдаемый дисбаланс цитокинов, очевидно, связан с предшествующей лучевой терапией и хирургическим лечением, вызывающими деструктивно-воспалительные процессы в тканях, и необходимостью восстановления клеточного гомеостаза в периферической крови

Характеристика иммунной системы и кроветворения у больных РМЖ через 1 месяц после окончания адьювантной ХТ

После 1-го этапа из исследования по разным причинам выбыли 15 пациенток. В результате на 2-м этапе в исследование были включены 35 пациенток, полностью завершивших комплексное противоопухолевое лечение. Решено было выдержать интервал в 30 дней после окончания ХТ, так как этот период позволяет исключить вероятность гематотоксического действия остаточных концентраций цитостатиков, но в то же время недостаточен для возобновления значимого роста опухоли. При отсутствии воздействия иммуносупрессорных факторов (лекарственных и опухоль-ассоциированных) результаты иммунологического обследования с максимальной достоверностью будут отражать репаративные возможности гемоиммунопоэза пациенток.

У больных РМЖ по сравнению со здоровыми донорами наблюдалось достоверное снижение содержания эритроцитов и гемоглобина при сохранении значений на уровне 1-го этапа обследования (табл. 1). В то же время у больных через 1 месяц после ХТ по сравнению с больными до ХТ наблюдалось достоверное снижение количества лейкоцитов (ниже уровня доноров) и нейтрофилов (в пределах нормативных значений), но среднее содержание лимфоцитов значимо не изменилось. Абсолютное количество моноцитов у всех пациенток по-прежнему находилось в пределах нормы.

При сравнении частотных показателей периферической крови у пациенток на 2-м и 1-м этапах статистически достоверным оказалось увеличение частоты абсолютной нейтропении (с 8% до 29%). Абсолютная лимфопения регистрировалась у большинства пациенток - в 80% случаев. Лабораторные признаки анемии наблюдались почти с одинаковой частотой до и после ПХТ.

У больных РМЖ через 1 месяц после ХТ абсолютные значения всех определяемых по CD-маркерам популяций клеток по-прежнему были достоверно снижены (табл. 2). По сравнению с 1-м этапом исследования отмечалось нарастание количественного дефицита всех субпопуляций Т-лимфоцитов, которое было статистически значимым в отношении абсолютного содержания $CD8^+$ и относительного содержания $CD3^+$ Т-клеток. Дальнейшее уменьшение абсолютного количества $CD3^+$ и $CD4^+$ Т-лимфоцитов проявлялось только в виде тенденции. Снижение ИРИ сохранялось и после ХТ. При оценке функциональной активности Т-клеточного звена иммунитета, как и до ХТ, наблюдалось достоверное уменьшение ИИМ, что указывало на повышенную продукцию Т-лимфоцитами факторов, ингибирующих миграцию лейкоцитов.

При анализе моноцитарного звена иммунитета у больных сохранялось снижение фагоцитарной активности моноцитов и достоверно уменьшался ПАМ, который до ХТ оставался сохранным. Изменения функциональной активности нейтрофилов через месяц после завершения ХТ имели такой же характер, что и на этапе 1-го иммунологического обследования.

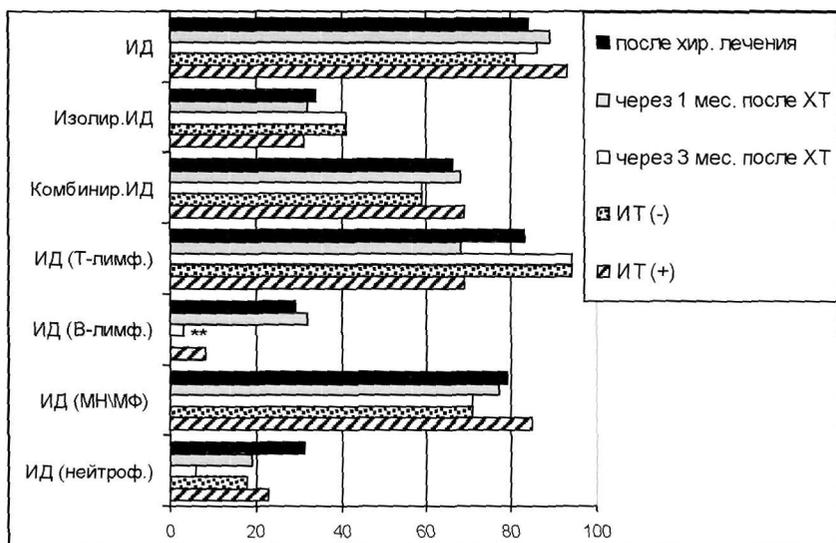


Рис. 1. Структура иммунодефицита (ИД) у больных РМЖ (%)

В целом лабораторные признаки иммунодефицитного состояния на 2-м этапе исследования определялись у 89% пациенток. При этом структура иммунодефицита также сохранялась в основном прежней (рис. 1): комбинированные нарушения - 68%, изолированные нарушения - 32%, дефицит по Т-клеточному звену иммунитета - 68%, по В-клеточному звену - 32%, недостаточность функции моноцитов/макрофагов - 77%, функции нейтрофилов - 19%.

Анализ продукции цитокинов клетками крови (табл. 3), показал, что через 1 месяц после окончания ХТ у больных сохранялось достоверное повышение спонтанной продукции ИЛ-7 и отмечалось дальнейшее нарастание спонтанной секреции G-CSF (5-кратное относительно уровня до ХТ). При этом возрастание продукции G-CSF, по-видимому, связано с нейтропенией, которая практически не регистрировалась до химиотерапии и выявлялась у трети больных после ХТ. С другой стороны, учитывая широкий потенциал иммуносупрессивной активности G-CSF, увеличение данного цитокина на фоне ХТ в отсутствии динамики Th2-цитокинов может указывать, что ХТ-индуцированная иммуносупрессия обусловлена не столько смещением баланса в сторону Th2-цитокинов, сколько усилением продукции G-CSF.

После ХТ высокая продукция MIP-1 β сохранялась. Однако спонтанная секреция MCP-1 достоверно снижалась практически до уровня донорских значений. Причем дополнительная стимуляция ЛПС не привела к увеличению продукции хемокинов. Анализ цитокинов, регулирующих воспалительный процесс, показал, что через месяц после ХТ в целом баланс смещался в сторону ослабления провоспалительной активности клеток крови (значимое снижение спонтанной продукции ИЛ-1 β и ИЛ-17 ниже уровня доноров, снижение ЛПС-стимулированной

продукции IL-12 до уровня доноров) Значения продукции IL-13 и IL-5 после ХТ не менялись

После окончания ХТ у 17 из 35 пациентов (49%) наблюдался инфекционный синдром Herpes zoster - 2 человека, Herpes simplex (первый эпизод или рецидив после длительной ремиссии) – 2 человека, обострение хронического бронхита – 2 человека, обострение хронического аднексита – 1 человек, острая инфекция ЛОР-органов (тонзиллит, гайморит, ОРВИ) -5 человек, абсцесс послеоперационного рубца - 2 человека, постинъекционный тромбофлебит – 2 человека, стоматит – 1 человек При сравнении иммунологических и гематологических параметров в подгруппах больных оппозитивных по инфекционному синдрому выявлены достоверные различия только по уровню митоген-индуцированной продукции цитокинов – у пациентов с развитием инфекционных осложнений отмечались выше уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-17, Th2-цитокина IL-13, фактора гемопоэза GCSF и хемокина MCP Сформированные подгруппы не различались значимо по возрасту и распределению больных по стадии РМЖ

46% пациентов (16 из 35 человек) во время ХТ дополнительно к основному протоколу лечения получали иммунотерапию по рекомендациям химиотерапевта – препарату ДНК деринат (внутримышечно №5-10) Он, как и большинство препаратов нуклеиновых кислот, обладает регенераторным и репаративным действием, стимулирует лейкопоэз Через 1 месяц после завершения ХТ было проведено сравнение клинико-лабораторных параметров в подгруппах больных, получавших и не получавших деринат Сформированные подгруппы были клинически однородны

Таблица 4

Сравнительная лабораторная характеристика больных РМЖ через 1 месяц после ХТ с наличием/отсутствием иммунотерапии (деринат) во время ХТ,

$M \pm s e$

Параметры	Иммунотерапия (-), n=19	Иммунотерапия (+), n=16	Достоверность различий
Лейкопения <4 0 x10 ⁹ /л	8 (42%)	7 (44%)	0,59 (ТМФ)
Лимфопения <1 2 x10 ⁹ /л	14 (74%)	14 (88%)	0,27(ТМФ)
Нейтропения <2 0 x10 ⁹ /л	5 (26%)	5 (31%)	0,52 (ТМФ)
Лимфоциты ВК (x10 ⁹ /л)	0,96 \pm 0,09	0,78 \pm 0,09	0,20 (p _u)
Эритроциты (x10 ¹² /л)	4,3 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	0,009 (p_u)
IL-13 спонт. (пкг/мл/10⁶МНК)	2,3 \pm 0,1 (n=6)	5,9 \pm 1,0 (n=7)	0,05 (p_u)

Примечание ТМФ – точный метод Фишера, p_u – U-критерий Вилкоксона-Манна Уитни

Анализ частоты развития инфекционного синдрома показал, что в подгруппе с иммунотерапией инфекционные осложнения развивались в 2 раза чаще - в 69% случаев (11/16), чем в оппозитивной группе - в 32% случаев (6/19), выявленные различия были достоверными по методу Фишера После применения препарата ДНК

наблюдалась тенденция к увеличению количества пациентов с лейкопенией, лимфопенией и нейтропенией (табл 4) У пациентов, получавших иммунотерапию во время ХТ, достоверно ниже наблюдалось среднее содержание эритроцитов и выше - продукция противовоспалительного цитокина ИЛ-13, хотя в обеих группах значения последнего регистрировались достоверно ниже уровня доноров

Характеристика иммунной системы и кроветворения у больных РМЖ через 3 месяца после окончания адьювантной ХТ

Анализ показателей гемограммы показал, что через 3 месяца после ХТ у больных наблюдалось увеличение количества лейкоцитов (до нормативных значений) и достоверное повышение абсолютного количества лимфоцитов (ниже уровня доноров) по сравнению с результатами обследования через 1 месяц после ХТ (табл 1) Абсолютное количество нейтрофилов и моноцитов, сохранилось в пределах значений доноров Анализ показателей эритропоэза у больных РМЖ в исследуемой группе выявил положительную динамику по содержанию гемоглобина, тогда как количество эритроцитов сохранялось ниже уровня доноров - как на предыдущих этапах обследования При сравнении частотных показателей цитопении у пациентов на 3-м этапе исследования с аналогичными показателями 2-го этапа выявлено достоверное снижение частоты лимфопении (с 80% до 46%), тенденция к снижению частоты лейкопении и анемии

У больных РМЖ через 3 месяца после ХТ при анализе параметров иммунитета достоверное снижение абсолютных значений всех исследуемых популяций клеток сохранялось (табл 2) Тем не менее, отмечался достоверный прирост абсолютного и относительного содержания В-лимфоцитов Увеличение абсолютного количества субпопуляций Т-лимфоцитов проявлялось в виде тенденции Учитывая значимое повышение доли CD8⁺ Т-лимфоцитов и дальнейшее снижение ИРИ в этот период, можно заключить, что прирост CD8⁺ Т-клеток опережает прирост CD4⁺ Т-лимфоцитов Также наблюдалось достоверное повышение ПЭФ, вероятно, за счет Т-клеток

При анализе моноцитарного звена иммунитета у больных наблюдали сохранение дефицита фагоцитарной активности моноцитов и восстановление до уровня доноров ПАМ, который достоверно снижался через 1 месяц после ХТ Изменения функциональной активности нейтрофилов через 3 месяца после завершения ХТ имели такой же характер, что на этапах 1-го и 2-го иммунологического обследования - одновременное снижение фагоцитарной активности и усиление метаболической активности (ПАН)

Лабораторные признаки иммунодефицитного состояния на 3-м этапе исследования по-прежнему определялись у большинства пациенток - 86% По сравнению со 2-м этапом исследования наблюдались некоторые изменения структуры иммунодефицита (рис 1) По В-клеточной недостаточности наблюдалась положительная динамика - количество В-лимфоцитов через 3 месяца после ХТ практически у всех пациентов было в пределах нормативных значений ($p=0,004$, ТМФ) Но увеличилось относительное количество пациентов с признаками Т-клеточного дефицита, несмотря на отсутствие отрицательной динамики по абсолютному и относительному содержанию Т-лимфоцитов

Анализ продукции цитокинов клетками крови показал, что через 3 месяца после окончания ХТ у больных сохранялся повышенный уровень спонтанной продукции фактора гемоиммунопоза IL-7 без значимых отличий от значений у пациентов на первых этапах исследования (табл 3) Уровень IL-7 не увеличивался дополнительно при митогенной стимуляции В то же время отмечалось достоверное (16-кратное) снижение спонтанной секреции G-CSF относительно результатов через 1 месяц после ПХТ, но способность клеток крови к продукции этого цитокина под воздействием ЛПС сохранялась на высоком уровне ($ИВ_{лпс} = 35,8$) То нормализация уровня лейкоцитов и уменьшение выраженности лимфопении сочетались с уменьшением спонтанной продукции фактора гемоиммунопоза G-CSF Секретция MCP-1, начав снижаться после ХТ, через 3 месяца достигла уровня донорских значений Высокая спонтанная продукция MIP-1 β сохранялась, но была уже достоверно ниже, чем на 2-м этапе исследования Причем дополнительная стимуляция ЛПС приводила к увеличению продукции хемокинов, существенно большему, чем у доноров и пациентов на 1-м и 2-м этапах исследования $ИВ_{лпс}$ (MCP-1) = 45,1, $ИВ_{лпс}$ (MIP-1 β) = 4,0

Спонтанная продукция цитокинов с про- и противовоспалительной активностью на 3-м этапе обследования находилась на равномерно низком уровне Провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-17 и IL-12 секретировались клетками крови пациентов менее интенсивно, чем клетками доноров, достоверно в случае первых двух Продукция противовоспалительного цитокина IL-13 регистрировалась достоверно ниже уровня доноров, как и на других этапах исследования Секретция IL-5 через 3 месяца после ХТ наблюдалась на нижнем пороговом уровне, как и у доноров и у больных на протяжении всего исследования При этом стимуляция митогеном существенно усиливала продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-17 и IL-12 ($ИВ_{лпс} = 60,6, 34,3$ и $4,1$ соответственно), но не изменяла уровень IL-13 и IL-5

Помимо лабораторных изменений, характерных для пациентов на разных этапах наблюдения, на протяжении всего исследования отмечают и общие особенности гемоиммунопоза На всех трех этапах исследования наблюдается абсолютная лимфопения В структуре иммунодефицита преобладают комбинированные нарушения с преимущественным поражением Т- и моноцитарного звеньев иммунитета При этом Т-клеточный дефицит развивается в первую очередь за счет уменьшения содержания Т-лимфоцитов, тогда как их функциональная активность, связанная с продукцией факторов ингибции миграции лейкоцитов даже нарастает Дефект в моноцитарном звене напротив обусловлен изменением функциональных показателей при сохранении нормального количества этих клеток На всех этапах исследования проведенный нами корреляционный анализ выявляет выраженную обратную взаимосвязь между уровнем IL-7 и абсолютным количеством циркулирующих лимфоцитов у больных РМЖ (1-й этап - $r_s = -0,88, p < 0,0001$, 2-й этап - $r_s = -0,80, p < 0,001$, 3-й этап - $r_s = -0,87, p < 0,0001$) Абсолютная лимфопения, снижение ИРИ и увеличение уровня продукции IL-7 на протяжении всего исследования косвенно свидетельствуют о включении механизмов гомеостатической пролиферации

Влияние иммунокорригирующей терапии в раннем восстановительном периоде после ХТ на клинические и лабораторные показатели у больных РМЖ.

Для оценки результатов проведенной иммунореабилитации (ронколейкин, лейкоинтерферон и тимоген) проводилось сравнение через 3 месяца после окончания ХТ по лабораторным показателям подгрупп пациентов, получавших и не получавших иммунотерапию, а также через 1,5 и 2 года анализировались отдаленные результаты лечения – частота рецидивирования и выживаемость. Подгруппы были однородны по возрасту и стадии заболевания.

Средние значения содержания лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов существенно не различались между подгруппами больных в зависимости от иммунотерапии (табл 1). У больных РМЖ после иммунореабилитации выявлена нормализация количества эритроцитов и гемоглобина в отличие от пациентов без иммунотерапии, у которых их содержание оставалось сниженным. При сравнении частотных показателей отмечено после применения комбинации иммуномодуляторов значительное уменьшение частоты анемии по содержанию эритроцитов (с 33% до 7%), и в меньшей степени – частоты лейкопении (с 38% до 29%) и нейтропении (с 29% до 14%), однако метод Фишера не выявил достоверности различий по данным параметрам.

При сравнении параметров иммунитета через 3 месяца после ХТ у больных РМЖ, получавших и не получавших иммунотерапию по протоколу исследования, статистически достоверных различий не выявлено (табл 2). Но у пациентов после курса иммунотерапии наблюдалось некоторое снижение функциональной активности фагоцитов – в отличие от оппоритной подгруппы ПАМ определялся достоверно ниже уровня доноров, а ПАИ – в пределах значений доноров.

В связи с применением иммунотерапии наблюдались незначительные изменения структуры иммунодефицита в виде тенденции (рис 1). Количество пациентов с комбинированными иммунологическими нарушениями после применения комплекса иммуномодуляторов увеличилось с 59% до 69% и, соответственно, с изолированными нарушениями уменьшилось с 41% до 31%. С меньшей частотой регистрировался Т-клеточный иммунодефицит, но частота встречаемости дефицита функции моноцитов увеличилась.

Анализ продукции цитокинов у 9 пациентов, получавших иммунотерапию, и у 5 пациентов без иммунотерапии (табл 3) не выявил достоверных различий между подгруппами, оппоритными по иммунотерапии. Однако подгруппы пациентов различались по некоторым параметрам относительно нормативных значений. Так, в подгруппе женщин, получавших иммуностимуляторы, митоген-индуцированная продукция ИЛ-1 β регистрировалась достоверно сниженной (почти в 40 раз относительно другой подгруппы), а МСР-1, наоборот, повышенной. При оценке ИВ_{ЛПС} наблюдали, что у больных после иммунотерапии по сравнению с оппоритной подгруппой митоген оказывал значительно меньшее стимулирующее влияние на продукцию цитокинов ИЛ-1 β и G-CSF, и большее – на продукцию МСР-1.

У 46 пациентов из 50, включенных в исследование, проводилась оценка отдаленных результатов – частоты рецидивирования и выживаемости в сроки 1,5 и 2 года после окончания противоопухолевого лечения. В анализ исходов заболевания не были включены четверо пациентов, которые не завершили ХТ по протоколу.

настоящего исследования (в связи с развитием осложнений, прогрессией основного заболевания либо по причине отказа от продолжения ХТ) В итоге пациенты были разделены на две подгруппы в зависимости от иммунотерапии после 2-го этапа исследования 1) ИТ +/-, n=14, 2) ИТ -/-, n=32,

При сравнении подгрупп было выявлено, что у больных, получивших курс иммуностимуляторов по протоколу исследования, через 1,5 и 2 года с меньшей частотой наблюдались рецидивы РМЖ и летальные исходы в результате прогрессии РМЖ (табл 5) Однако достоверности этих различий по методу Фишера не выявлено

Таблица 5

Сравнительная характеристика исходов заболевания больных РМЖ в подгруппах в зависимости от проведения иммунотерапии после ПХТ (n)

	ИТ (-), n=32	ИТ (+), n=14
был рецидив за 1 5 года	22% (7)	14% (2)
был рецидив за 2 года	28% (9)	21% (3)
Умерли за 1 5 года	13% (4)	7% (1)
умерли за 2 года	22% (7)	14% (2)

Практические рекомендации

- 1 При проведении многокомпонентного противоопухолевого лечения необходимо мониторировать не только стандартные показатели периферической крови, но и иммунологические параметры с целью комплексной оценки влияния каждого из ятрогенных факторов на гемоиммунопоэз
- 2 Назначение стимуляторов иммуногемопоэза во время ХТ нецелесообразно, так как может способствовать увеличению выраженности и продолжительности постцитостатической цитопении за счет дополнительного «омоложения» кроветворения
- 3 Рекомендуется проводить иммунотерапию после окончания противоопухолевого лечения - в качестве иммунореабилитации

ВЫВОДЫ

- 1 У больных РМЖ на этапе завершения радиотерапии/хирургического лечения (до начала ХТ) регистрируется снижение содержания эритроцитов и гемоглобина, абсолютного количества лимфоцитов, ИРИ, фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов, что свидетельствует о выраженных нарушениях гемоиммунопоэза уже на ранних стадиях комплексной противоопухолевой терапии
- 2 У больных РМЖ на этапе завершения радиотерапии и хирургического лечения отмечается усиление продукции факторов гемопоэза (G-CSF, IL-7) и хемокинов (MCP-1, MIP-1 β), возрастание индуцированной продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-12, IL-17) и снижение уровня IL-13, что свидетельствует о сопряженности нарушений гемоиммунопоэза с выраженными изменениями цитокин-продуцирующей функции клеток

- 3 Развитие лимфопении, снижение ИРИ и увеличение уровня IL-7, который обратно коррелировал с абсолютным количеством лимфоцитов, являются косвенными признаками включения механизмов гомеостатической пролиферации уже на ранних этапах лечения, предшествующих ХТ
- 4 Проведение ХТ по протоколу АС (доксорубин и циклофосфамид) у больных РМЖ сопровождается развитием лейко- и нейтропении, снижением относительного количества CD3+ Т-клеток и абсолютного количества CD8+ Т-клеток, выраженным усилением спонтанной продукции G-CSF и ослаблением продукции цитокинов/хемокинов с провоспалительной активностью (MIP-1 β , IL-12, IL-17), что свидетельствует об углублении нарушений гемоиммунопоза. При этом больные с развившимися инфекционными осложнениями характеризуются более высоким уровнем стимулированной продукции медиаторов как с провоспалительной (IL-1, IL-17, MCP-1), так и противовоспалительной/иммуносупрессивной (G-CSF и IL-13) активностью
- 5 Назначение иммунотерапии препаратом ДНК во время проведения ХТ у больных РМЖ не сопровождается коррекцией параметров иммунитета в раннем восстановительном периоде после ХТ и ассоциируется со снижением содержания эритроцитов и нарастанием частоты инфекционных осложнений
- 6 Больные РМЖ в раннем восстановительном периоде (через 3 месяца после окончания ХТ) характеризуются купированием лейкопении, уменьшением выраженности лимфопении, нейтропении и анемии, возрастанием ряда иммунологических показателей (абсолютного количества CD8+ Т-клеток, CD19+В-клеток, NK-клеток, ПЭФ), уменьшением повышенной продукции G-CSF, MCP-1, MIP-1 β , IL-1, IL-17, IL-12 и возрастанием сниженной продукции IL-13, что является признаками восстановления гемоиммунопоза
- 7 Короткий курс комбинированной иммунотерапии (ронколейкин, лейкинферон, тимоген) в восстановительном периоде после ХТ приводит к нормализации содержания эритроцитов и гемоглобина, снижению повышенной продукции перекиси водорода нейтрофилами, а также подавлению ЛПС-индуцированной продукции IL-1 β клетками крови, что свидетельствует о противовоспалительном эффекте иммунокоррекции и способствует купированию анемического синдрома

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Использование комплекса неспецифических иммуномодуляторов в реабилитации больных раком молочной железы / **Ю.Б. Селихова**, НМ Старостина, В А Козлов, Н П Кузнецова // Медицинская иммунология - 2003 - Т 5, № 3-4 - С 458-459
- 2 Иммунотерапия в онкологии / **Ю.Б. Селихова**, НМ Старостина // Иммунотерапия аллергических, аутоиммунных и других заболеваний. Методическое руководство / Под ред Академика РАМН, проф В А Козлова - Новосибирск АГРО-СИБИРЬ, 2004 - 127с
- 3 Особенности иммунодефицита у больных раком молочной железы и возможности его коррекции / **Ю.Б. Селихова**, НМ Старостина, ЕР Черных, В А Козлов // Russian Journal of immunology - 2004 - Volume 9, Suppl 1 - P 300
- 4 Иммунные дисфункции у больных раком молочной железы после лучевой терапии и мастэктомии / **Ю.Б. Селихова**, И Б Останина, ЕР Черных, А А

- Останин, НМ Старостина, В С Кожевников, В А Козлов // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной онкологии - сборник материалов регионарной конференции молодых ученых - Томск, 2006 - С 53
- 5 Иммунологические особенности больных раком молочной железы после лучевой терапии и мастэктомии / **Ю.Б. Селихова**, ИБ Останина, ЕР Черных, АА Останин, НМ Старостина, В С Кожевников, В А Козлов // Медицинская иммунология – 2006 – Т 8, № 2-3 - С 349-350
- 6 Иммунологические и гематологические нарушения у больных раком молочной железы при проведении противопухолевой терапии / **Ю.Б. Селихова**, ИБ Останина, В А Козлов, С В Сидоров, ЕР Черных, АА Останин, НМ Старостина, Н В Пронкина, И В Шишкова, В С Кожевников, Е В Меняева // Материалы 7-й отчетной конференции ГУ НИИ КИ СОРАМН Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека от эксперимента к клинике - 2006 - С 207
- 7 Характеристика цитокинового статуса у больных раком молочной железы при проведении противоопухолевой терапии и последующей иммунотерапии / **Ю.Б. Селихова**, ИБ Останина, В А Козлов, С В Сидоров, ЕР Черных, АА Останин, НМ Старостина // Материалы 7-й отчетной конференции ГУ НИИ КИ СОРАМН Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека от эксперимента к клинике – 2006 - С 205
- 8 Влияние циторедуктивных лечебных факторов на гемоиммунопоэз и продукцию цитокинов у больных раком молочной железы / **Ю.Б. Селихова**, ИБ Останина, НМ Старостина, С В Сидоров, Е В Меняева, В С Кожевников, ЕР Черных, АА Останин, В А Козлов // Омский научный вестник – 2007 - № 3 (61) – С 248
- 9 Параметры иммунитета у больных раком молочной железы после лучевой терапии и хирургического лечения / **Ю.Б. Селихова**, ИБ Останина, В А Козлов, С В Сидоров, ЕР Черных, АА Останин, НМ Старостина // Аллергология и иммунология – 2007 – Т 8, № 1 – С 81
- 10 Параметры иммунитета у больных раком молочной железы после лучевой терапии и хирургического лечения / **Ю.Б. Селихова**, ИБ Останина, НМ Старостина, С В Сидоров, Е В Меняева, В С Кожевников, ЕР Черных, АА Останин, В А Козлов // Медицинская иммунология – 2007 – Т 9, № 4-5 – С 419-428

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

IL	- интерлейкин
MCP	- monocyte chemoattractant protein
MIP	- macrophage inflammatory protein
ВК	- венозная кровь
ИВ _{ЛПС}	- индекс влияния липополисахарида
ИД	- иммунодефицит
ИИМ	- индекс ингибции миграции
ИМ	- индекс миграции
ИРИ	- иммунорегуляторный индекс (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)
ИТ	- иммунотерапия
НК	- натуральные киллеры
ПАМ	- показатель активации моноцитов
ПАН	- показатель активации нейтрофилов
ПК	- периферическая кровь
ПЭФ	- показатель эффекторных функций
РМЖ	- рак молочной железы
ХТ	- химиотерапия

