

*На правах рукописи*



**СНЕЖКО Татьяна Александровна**

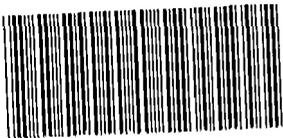
**ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ  
ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВАМИ И РЕФРАКТЕРНЫМ  
ТЕЧЕНИЕМ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА**

14.01.12 – онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

11 НОЯ 2015



005564148

Ростов-на-Дону – 2015

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ  
УЧРЕЖДЕНИИ «РОСТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(директор – д.м.н., профессор О.И. Кит)

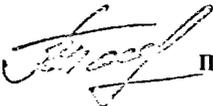
- Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор  
**Лысенко Ирина Борисовна**
- Научный консультант:** доктор медицинских наук, профессор  
**Ушакова Наталья Дмитриевна**
- Официальные оппоненты:** **Шатохин Юрий Васильевич** - доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гематологии и трансфузиологии с курсом клинической лабораторной диагностики, генетики и лабораторной генетики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, заведующий кафедрой
- Королева Ирина Альбертовна** – доктор медицинских наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра онкологии, доцент кафедры
- Ведущая организация:** государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последиplomного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится "13" 11 2015 г. в 13 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.208.083.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.rnioi.ru](http://www.rnioi.ru) ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан "16" 10 2015 г.

Ученый секретарь совета  
по защите докторских и кандидатских диссертаций,  
доктор медицинских наук, профессор

  
Позднякова В.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования.

Лимфопролиферативные заболевания, в том числе лимфома Ходжкина (ЛХ), представляют актуальную проблему современной онкологии, что обусловлено ростом заболеваемости, высокой частотой рецидивирующего течения и рефрактерных к химиотерапевтическому лечению форм онкологического процесса (Имянитов Е.Н., 2007; Демина Е.А., 2014; Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2014; Küppers R., 2012).

По данным ВОЗ, ежегодно на 100 тыс. человек регистрируется 2-4 случая ЛХ, что в структуре общей онкологической заболеваемости составляет 1%. Применение современных режимов химиолучевого лечения позволяет индуцировать полную ремиссию у 80-90% больных (Аршанская Е.Г., 2014). Однако в 5-10 % случаев регистрируется первичная рефрактерность к стандартной химиотерапии, а у 10 - 30% пациентов - рецидив заболевания после полученной ремиссии, и результаты лечения этой группы больных остаются неудовлетворительными (Птушкин В.В. и др., 2007; Богатырева Т.И. и др., 2012; Evens A.M., 2008; Sasse S. et al., 2012).

На основании многочисленных исследований установлено, что ЛХ следует рассматривать как опухоль, вовлекающую в свое развитие иммунную систему. Уже на ранних стадиях болезни диагностируется дефект функциональной активности Т-лимфоцитов, который сохраняется после успешного завершения курсов химио- или лучевой терапии, что не отражает тяжесть и характер течения заболевания. Дефект Т-клеточного иммунитета сохраняется и у больных, в течение многих лет находящихся в состоянии полной ремиссии, чего не происходит у лиц с другими формами лимфом при тех же методах лечения (Долгополова Е.В., 2005; Брюзгин В.В., 2014). Также установлено, что развитие ЛХ сопровождается гиперпродукцией регуляторных цитокинов как Th-1, так и Th-2 профиля с одновременной гиперэкспрессией молекулярно-биологических маркеров опухолевой прогрессии. Выявлена

прямая корреляционная зависимость выраженности этих изменений с множественной лекарственной резистентностью и безремиссионным течением заболевания (Скворцова Н.В. и др., 2004).

Иммунокомпетентные клетки обладают сложным рецепторным аппаратом, и под действием различных воздействий на мембранные структуры экспрессия рецепторов может изменяться, что отражается на свойствах самих клеток (Ярилин А. А., 1999; Хаитов Р.М., 2013). Это открывает широкие возможности для экстракорпоральной модуляции активности клеток иммунной системы с помощью различных иммуотропных препаратов (Златник Е. Ю., Голотина Л.Ю., 2005; Костюченко А. Л., 2004; Брюзгин В.В., 2014).

В настоящее время к препаратам, широко применяющимся в комплексном лечении системных опухолевых заболеваний, относятся цитокины, в частности, препараты интерферона- $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ) и рекомбинантного интерлейкина-2 (РИЛ-2) (Хаитов Р.М., 2013).

Известно, что при непосредственном воздействии ИФН- $\alpha$  на иммунокомпетентные клетки в них происходит ряд изменений: возрастает активность НК-клеток, повышается экспрессия CD-54 (адгезивного и активационного маркера) и снижается Fas – индуцированный апоптоз лимфоцитов (Ярилин А.А. и соавт., 2000; Кашенко Э.А., 2009; Леплина О.Ю., 2008). Это свидетельствует о выраженном повышении функциональной активности лимфоцитов при их инкубации *in vitro* с ИФН-  $\alpha$ .

РИЛ-2 обладает не только прямым лимфоцитотропным эффектом, но и опосредованным воздействием за счет модуляции продукции каскада цитокинов, что обуславливает множественность его противоопухолевого воздействия (Винсент Т. ДеВита, 2002; Златник Е.Ю., Голотина Л.Ю., 2005; Lopes de Menezes D.E., 2007; Long H.M., 2010).

Таким образом, исходя из вышесказанного, изучение эффективности применения в комплексе терапии больных ЛХ с рецидивирующим течением и первичной резистентностью иммунотерапии с применением РИЛ-2 и ИФН-  $\alpha$

определило актуальность данного исследования. В клинике Ростовского научно-исследовательского онкологического института были изучены возможности нового метода экстракорпоральной иммунотерапии в качестве дополнения к стандартной полихимиотерапии II линии.

### **Степень разработанности проблемы**

В настоящей работе были использованы наработки и развиты идеи российских и зарубежных авторов, касающиеся лечения пациентов с рецидивным и рефрактерным течением ЛХ (Птушкин В.В., 2007; Богатырева Т.И. и др., 2011; Филатова Л.В. и др., 2012; Жуков Н.В. и др., 2014; Garban F., 2008; Schmitz R., 2009; Kuruvilla J.et al., 2011). Несмотря на определенные успехи в этой области, стандартные подходы к лечению данной категории пациентов до сих пор не определены (Жуков Н. В. и др., 2014; Illes Á. et al., 2015). Роль иммунотерапии остается неясной, хотя известны успешные попытки ее применения у первичных больных с ЛХ (Сторожакова А.Э., 2006) и при других типах лимфом (Айрапетов К.Г., 2002). Таким образом, поиск путей оптимизации и повышения эффективности лечения этих больных остается актуальной проблемой онкологии.

### **Цель исследования**

Улучшение результатов лечения пациентов с ранними рецидивами и рефрактерным течением лимфомы Ходжкина путем включения в комплексное лечение экстракорпоральной иммунотерапии рекомбинантного интерлейкина-2 и интерферона- $\alpha$ .

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

1. Исследовать экспрессию дифференцировочных и апоптотических рецепторов лейкоцитами больных с ранними рецидивами и рефрактерным течением лимфомы Ходжкина в динамике их инкубации с рекомбинантным интерлейкином-2 и интерфероном- $\alpha 2b$  для определения оптимального режима экстракорпоральной иммунотерапии.

2. Изучить непосредственные и ближайшие результаты лечения больных с ранними рецидивами и рефрактерным течением лимфомы Ходжкина при применении полихимиотерапии в сочетании с экстракорпоральной иммунотерапией.
3. Оценить характер побочных токсических реакций полихимиотерапии в сочетании с экстракорпоральной иммунотерапией и стандартной полихимиотерапии.
4. Исследовать изменения показателей иммунного статуса под воздействием проводимой иммуностропной терапии.
5. Изучить влияние метода селективной экстракорпоральной иммунотерапии на структуру интегральных адаптационных реакций организма.
6. Изучить морфологическую картину твердотельных фаций плазмы крови у больных с рецидивирующим и рефрактерным течением лимфомы Ходжкина в динамике лечения.

#### **Научная новизна исследования**

Впервые разработан и клинически апробирован метод лечения больных с рецидивным и рефрактерным течением лимфомы Ходжкина путем включения в комплексное лечение экстракорпоральной иммунотерапии, что осуществляется путем инкубации аутолейкомассы больных, полученной методом афереза, с РИЛ-2 и ИФН- $\alpha$ 2b. Экспериментально подобраны оптимальные режимы воздействия иммунопрепаратов на лейкоциты периферической крови.

Впервые оценена эффективность и токсичность метода экстракорпоральной иммунотерапии в сочетании со стандартной полихимиотерапией II линии у больных с первично-резистентным течением лимфомы Ходжкина и первым ранним рецидивом заболевания. Показаны более высокая эффективность и меньшая токсичность полихимиотерапии в сочетании с иммунотерапией по сравнению со стандартной полихимиотерапией II линии в лечении данной категории больных.

В работе впервые оценено воздействие метода экстракорпоральной иммунотерапии на показатели иммунного статуса. Показано, что применение иммуномодуляторов: РИЛ-2 и ИФН- $\alpha$ 2b, инкубированных с аутолейкомассой больных, в курсе химиотерапии у больных рецидивной и рефрактерной ЛХ вызывает стимуляцию Т-хелперного звена иммунной системы, обладает протекторным действием на лимфоциты, подвергающиеся активационному апоптозу, развивающемуся при применении стандартной полихимиотерапии II линии.

Впервые изучена структура общих неспецифических адаптационных реакций и морфология сыворотки крови у больных с рецидивами и рефрактерным течением лимфомы Ходжкина на этапах полихимиотерапии с включением экстракорпоральной иммунотерапии. Доказано системное биоадаптивное влияние иммуномодифицированной химиотерапии, заключающееся в увеличении частоты формирования устойчивых нормотипов интегральных антистрессорных реакций, частота которых многократно превышала показатели контроля, полученные у больных, получавших стандартную схему полихимиотерапии II линии. Полученные изменения морфологии бесклеточной ткани крови продемонстрировали сходство восстановительной динамики адаптивного гомеостаза организма при эффективной иммунохимиотерапии.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

С целью повышения эффективности комплексного лечения больных с первично-резистентным течением лимфомы Ходжкина и первым ранним рецидивом заболевания IIB-IVB стадий в клинике разработан и внедрен метод экстракорпоральной иммунотерапии. Новый оригинальный способ иммунокоррекции в сочетании с полихимиотерапией II линии, разработанный в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте, был применен при лечении данной категории больных. Показано улучшение непосредственных и ближайших результатов лечения по сравнению с группой

больных, получавших стандартную полихимиотерапию II линии. В основной группе отмечена лучшая переносимость и уменьшение частоты токсичных эффектов терапии. Установлено положительное влияние внедренной методики на показатели клеточного иммунитета, обнаружено системное биоадаптивное влияние иммуномодифицированной химиотерапии, заключающееся в увеличении формирования устойчивых нормотипов интегральных антистрессорных реакций. Отсутствие больших материальных затрат для выполнения методики экстракорпоральной иммунотерапии, сокращение сроков пребывания больного на койке за счет снижения частоты осложнений позволяют использовать их в любом специализированном онкологическом учреждении. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего изучения применения иммунотерапии в онкологии.

#### **Методология и методы исследования**

Основу исследования составили 60 больных, получавших полихимиотерапию II линии (схема DNAP) по поводу первого раннего рецидива или резистентной к терапии ЛХ. Все больные были разделены на 2 группы по 30 человек – основную и контрольную. У пациентов основной группы комплекс лечения был дополнен экстракорпоральной иммунотерапией с использованием РИЛ-2 и ИФН- $\alpha$ 2b. Группы больных были сопоставимы между собой по полу, возрасту, локализации и распространенности онкологического процесса, наличию В-симптомов заболевания. Клиническую эффективность проводимого лечения оценивали по наступлению объективного ответа на терапию, подтвержденного данными физикального обследования, а также инструментальными методами (ультразвуковой, рентгенологический). Для оценки безопасности проводимого лечения изучали частоту встречаемости и тяжесть токсических осложнений. Для оценки ближайших результатов лечения оценивали общую и бессобытийную выживаемость. При проведении работы использовали совокупность методов: клинических, морфологических, иммунологических, иммуногистохимических.

### **Внедрение результатов исследования**

Метод экстракорпоральной иммунотерапии внедрен и применяется в отделении гематологии клиники Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

### **Основное положение, выносимое на защиту**

При лечении больных с первично-резистентным течением лимфомы Ходжкина и первым ранним рецидивом заболевания целесообразно использование метода экстракорпоральной иммунотерапии с интерфероном- $\alpha 2b$  и рекомбинантным интерлейкином-2 в сочетании со стандартной полихимиотерапией II линии.

### **Степень достоверности результатов исследования**

Научные положения диссертации основываются на данных литературы и собственных исследований. Результаты исследования подтверждены достаточным количеством клинических наблюдений – 60 пациентов с рецидивами и рефрактерной лимфомой Ходжкина. Методологически правильно использован широкий спектр достаточно современных клинико-лабораторных методов исследования. Полученные результаты детально обсуждены и статистически обработаны, что подтверждает их достоверность.

### **Апробация диссертации**

Результаты проведенных исследований доложены и обсуждены на научно-практических конференциях врачей города Ростова-на-Дону, Ростовской области (2013, 2014), на международном форуме «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (Казань, 2014), Юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции», посвященной 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России (Санкт-Петербург, 2014 г.), VIII съезде онкологов и радиологов СНГ и Евразии (Казань, 2014 г.), Всероссийской конференции молодых ученых (Ростов-на-Дону, 2015 г.), 1-ом Российском онкологическом научно-образовательном форуме с

международным участием «Белые Ночи – 2015» (Москва, 2015). Апробация диссертационной работы состоялась 25.06.2015 г. на заседании Ученого Совета Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Основные научные положения и выводы, описанные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности 14.01.12 онкология. Результаты работы соответствуют пункту 6 (внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов) области исследования.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно выполнялась процедура экстракорпоральной иммунотерапии, сбор, обобщение и анализ клинического материала, статистическая обработка полученных данных.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 11 научных работ, в том числе 2 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, получен патент на изобретение «Способ лечения больных с рефрактерным и рецидивным течением лимфомы Ходжкина» № 2487727.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы, включающего 163 литературных источника (88 отечественных и 75 зарубежных), работа содержит 18 таблиц и 68 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Характеристика клинического материала и методов исследования

Материалом настоящего исследования стали данные о 60 больных, проходивших лечение в отделении гематологии РНИОИ в период с 2010 г. по 2012 г. включительно по поводу первично-резистентного течения лимфомы Ходжкина и первого раннего рецидива заболевания, IIB-IVB стадий, в возрасте 22-58 лет.

В исследование включены 24 больных лимфомой Ходжкина с первично - резистентным течением и 36 больных, у которых диагностирован первый ранний рецидив заболевания. В зависимости от метода лечения больные случайным образом были разделены на две группы: основная – 30 больных, которым проводилась полихимиотерапия II линии по схеме DHAP в сочетании с экстракорпоральной иммунотерапией, и контрольная – 30 больных, получавших стандартную полихимиотерапию II линии по схеме DHAP.

Группы больных были сопоставимы по возрасту, общему статусу, стадии заболевания, гистологической структуре и градации опухоли, наличию симптомов опухолевой интоксикации.

В обеих группах наблюдался возрастной пик заболеваемости, приходящийся на промежуток 25-29 лет. Большинство заболевших были мужского пола – 36 человек (60%), также обращало на себя внимание преобладание мужчин в группе с резистентной к терапии ЛХ, наиболее неблагоприятном варианте течения заболевания. Во всех случаях была диагностирована классическая ЛХ, преобладающими гистологическими вариантами являлись нодулярный склероз и смешанно-клеточный тип. Доминировали поздние стадии заболевания.

После установления первично-резистентной к терапии формы заболевания или раннего рецидива ЛХ больным основной группы проводилось 6 курсов полихимиотерапии II линии по схеме DHAP (Дексаметазон 40 мг внутрь или внутривенно с 1 по 4 дни; Цисплатин 100 мг/м<sup>2</sup> в/в в 1 день;

Цитарабин 2000 мг/м<sup>2</sup> в/в в течение 3 часов каждые 12 часов во 2 день; интервал между курсами 28-35 дней) в сочетании с экстракорпоральной иммунотерапией, больные контрольной группы получали 6 курсов традиционной полихимиотерапии по той же схеме. Дозы цитостатиков рассчитывали индивидуально по номограмме соотношения роста, массы и поверхности тела.

Лечение больных основной группы дополнялось *экстракорпоральной иммунотерапией*, метод которой заключался в следующем: после предварительного введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), проводимого за 24 часа до процедуры в целях выброса в периферический кровоток функционально-активных клеток, больному проводили процедуру лейкоцитафереза с использованием сепаратора крови MCS «Haemonetics» (США). Полученную лейкомассу делили на 2 порции, собирали в стерильные пластиковые контейнеры «Гемакон» и инкубировали в течение 24 часов при температуре 37<sup>0</sup>С: первую порцию с рекомбинантным интерлейкином-2 (Ронколейкин, БИОТЕХ, Россия) в дозе 5 тыс. МЕ/мл, вторую порцию с интерфероном- $\alpha$ 2b (Лайфферон, Вектор-Медика, Россия) в дозе 10 тыс. МЕ/мл, реинфузию лейкомассы проводили внутривенно капельно за одни сутки до проведения курса полихимиотерапии. По завершении курса химиотерапии процедуру повторяли в той же последовательности. Иммунотерапия проводилась во 2 и 4 циклы полихимиотерапии II линии первично-резистентной формы и раннего рецидива лимфомы Ходжкина.

Объективный лечебный эффект оценивался у больных основной и контрольной групп после 6-ти курсов химиотерапии с помощью физикального обследования, ультрасонографического и рентгенологического исследований согласно критериям, рекомендованным ВОЗ (Женева, 1979). Динамику В-симптомов общей интоксикации оценивали по их наличию либо отсутствию. Анализ вида и степени токсичности проводился согласно шкале токсичности, рекомендованной ВОЗ (Переводчикова Н. И, 2015 г.).

Для оценки ближайших результатов лечения была изучена двухлетняя скорректированная общая overall survival (OS) (от начала лечения до летального исхода от любой причины) и бессобытийная выживаемость event-free survival (EFS) (от начала лечения до любого события – рецидив, прогрессия, летальный исход) больных лимфомой Ходжкина с резистентными к терапии формами заболевания и ранними рецидивами, вычисленная динамическим (актуриальным) методом (Kaplan E.L., Maier P., 1958).

Для оценки иммунного статуса больных в периферической крови методом проточной цитофлюорометрии на аппарате BD FACSCanto определяли следующие показатели: общее и относительное количество лимфоцитов и их субпопуляций (CD3, CD19/20, CD4, CD8, CD16/56, HLA-DR и ДНК-цитометрические показатели крови). Для оценки апоптоза/некроза применялся аннексиновый тест. Все показатели клеточного иммунитета рассчитывали в относительном (процентном) и абсолютном исчислении. Оценку иммунного статуса проводили всем больным до начала терапии и на этапах лечения – после 2-х и 4-х курсов ПХТ.

Изучение морфологической картины твердотельных фаций сыворотки крови выполнялось методами клиновидной и краевой дегидратации (Шабалин В.Н., Шатохина С.Н., 2010). Микроскопирование производилось в световом и поляризационном режимах на микроскопе leicaDMLS2.

Идентификация адаптационных реакций проводилась по методу Л.Х. Гаркави с соавт. (1975, 2002) с расчетом коэффициента соотношения антистрессорных реакций и стресса (Шихлярова А.И., Максимов Г.К., 2006 г.).

Статистическая обработка клинических и лабораторных данных проводилась согласно общепринятым методикам с помощью параметрических (по критерию Стьюдента) и непараметрических (по точному критерию Фишера; по парному критерию Вилкоксона-Пето, критерию Кокса, критерию Гехана-Вилкоксона) методов (Гублер Е.В., Генкин А.А., 1973; Федорова Э.Г., 1985) с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

Различие считалось статистически достоверным при вероятности безошибочного прогноза  $\geq 95\%$  ( $p \leq 0,05$ ).

### Результаты исследования

Определение оптимальных режимов инкубации в присутствии РИЛ-2 и ИФН- $\alpha 2b$  лейкомаcсы, полученной у больных с резистентным и рецидивным течением лимфомы Ходжкина, показало, что статистически значимые изменения выявлены при обработке аутологичной клеточной массы цитокинами в течение 24 часов. Добавление РИЛ-2 индуцировало достоверное повышение в сравнении с исходным фоном относительного содержания CD3+ Т-лимфоцитов в 1,1 раза, CD3+CD4+ Т-лимфоцитов в 1,2 раза, доли активированных цитотоксических CD3+CD8+HLA-DR лимфоцитов в 1,3 раза. Показатели раннего апоптоза снижались с 21% до 16,3%. Инкубация клеточной массы в присутствии ИФН- $\alpha 2b$  в течение 24 часов также приводила к достоверному росту количества активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD8+HLADR+ в 1,25 раз. Отмечалась тенденция к снижению показателей раннего апоптоза, повышению значений относительного содержания CD3+CD4+ и активированных CD3+HLA-DR Т-лимфоцитов, CD19+ В-лимфоцитов. Выявлена тенденция к повышению темпа и индекса пролиферативной активности лимфоцитов при инкубации в течение 24 часов в присутствии изучаемых цитокинов.



Рис. 1. Непосредственные результаты лечения больных в основной и контрольной группах.

\*- Разница показателей достоверна по отношению к контрольной группе ( $p \leq 0,05$ )

Анализ объективного эффекта (полная и частичная ремиссия) после завершения 6-ти курсов полихимиотерапии (рис. 1) показал, что в основной группе больных объективного эффекта удалось достичь у 25 больных из 30 (83,3%), а в группе, получавшей стандартную полихимиотерапию II линии - у 18 человек (60%), что оказалось в 1,38 раза ниже, различия статистически значимы ( $p=0,02$ ). Стабилизация опухолевого процесса в группах сравнения наблюдалась у 13,3% больных основной и 26,7% больных контрольной группы. Прогрессирование заболевания в основной группе регистрировалось только в 1 случае (3,4%), в группе пациентов, подвергшихся стандартной полихимиотерапии, диагностировано у 4 больных (13,3%). Клинический ответ на проводимое лечение также оценивался по наличию или отсутствию В-симптомов, которые до лечения наблюдались у всех больных. Уже после 2-х курсов терапии симптомы общей интоксикации исчезли у 90% больных основной группы, против 60% в группе контроля ( $p\leq 0,05$ ).

Основными токсическими проявлениями проводимого лечения были гематологические (лейкопения, анемия, тромбоцитопения) и диспептические (тошнота, рвота) (рис. 2), а также гипертермические реакции.

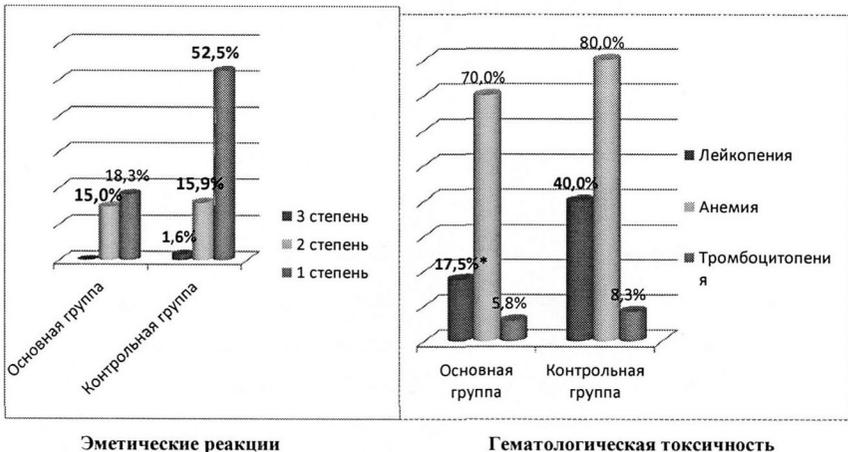


Рис. 2. Токсические осложнения химиотерапии у больных в изучаемых группах

\* - Разница показателей достоверна по отношению к контрольной группе ( $p\leq 0,05$ )

У больных, в лечении которых применялась экстракорпоральная иммунотерапия, удалось достичь снижения таких токсических осложнений, как лейкопения - 17,5% против 40% ( $p < 0,05$ ), диспептического синдрома - 33,3% против 70,0% ( $p < 0,05$ ). У 80% больных основной группы при проведении экстракорпоральной иммунотерапии зафиксирована температурная реакция 1-3 степени, которая была связана с синдромом выброса цитокинов и была расценена как проявление опосредованного противоопухолевого действия иммуномодуляторов.

Показатели общей выживаемости в течение 2 лет наблюдения в обеих группах отличались незначительно и составили 64,7% больных в основной группе и 60,9% в контроле (Рис. 3).

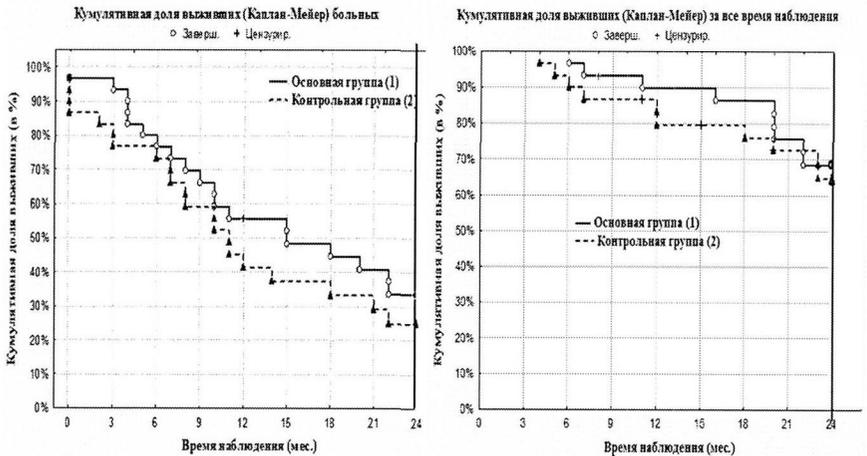


Рис. 3. Общая выживаемость и выживаемость без событий в изучаемых группах

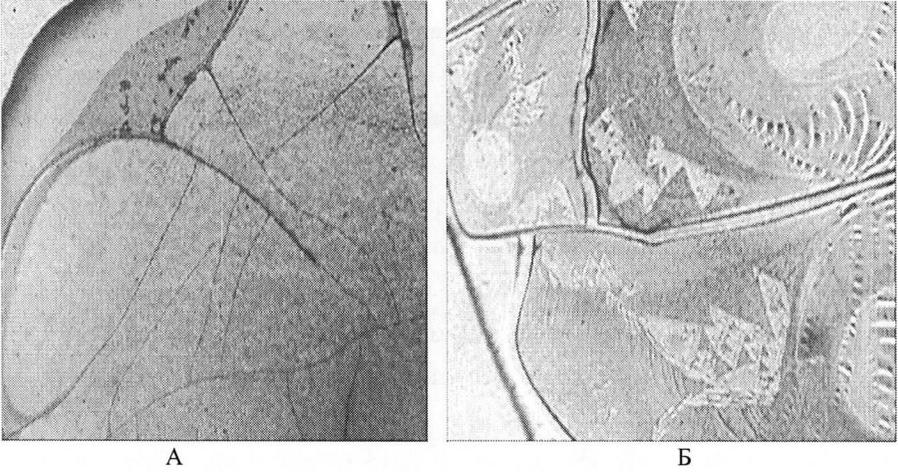
Однако проведенный анализ 2-х годичной бессобытийной выживаемости свидетельствовал о том, что в группе применения экстракорпоральной иммунотерапии больные жили без признаков прогрессирования заболевания дольше в среднем на 2-3 месяца по сравнению с получившими стандартное лечение. Средняя продолжительность жизни больных основной группы

составила  $20,8 \pm 1,04$  мес., в контрольной группе  $19,4 \pm 1,27$  мес., срок жизни без рецидива составил  $14,23 \pm 1,56$  мес. в основной группе и  $11,43 \pm 1,58$  мес. Больным основной группы в 16,6% случаев удалось в дальнейшем выполнить высокодозную химиотерапию с аутотрансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (наиболее эффективный компонент комплексного лечения), в группе контроля ему подверглись только 6,7% больных.

При изучении иммунного статуса больных на этапах лечения выявлены благоприятные изменения у пациентов основной группы в сравнении с контролем. Так, уже после 2-го курса лечения, включающего экстракорпоральную иммунотерапию, отмечен достоверный рост количества CD3+CD4+ лимфоцитов с  $36,2 \pm 5,1\%$  до  $49,8 \pm 3,15\%$  ( $p < 0,05$ ), тогда как у больных контрольной группы наблюдалась тенденция к снижению этого показателя, различия сохранялись после окончания лечения. В контрольной группе выявлено достоверное повышение содержания NK-клеток в процессе проводимой терапии с  $5,05 \pm 1,38\%$  до  $10,6 \pm 1,1\%$  ( $p < 0,05$ ), что наблюдается при снижении их функциональной активности и является компенсаторным. Одновременно в контрольной группе наблюдалось двукратное повышение процента лимфоцитов, находящихся в состоянии апоптоза с  $14,6 \pm 3,23\%$  до  $29,0 \pm 4,37\%$  ( $p < 0,05$ ). У больных основной группы подобных изменений не отмечено, показатели раннего апоптоза были достоверно ниже показателей контроля и составили  $16,7 \pm 4,25\%$  ( $p < 0,05$ ). Несмотря на то, что количество В-лимфоцитов (CD19+) находилось на низком уровне в обеих группах и не демонстрировало статистически достоверных изменений в ходе лечения, отмечена тенденция к повышению его в основной группе и, напротив, угнетению в контрольной. Выявлено, что развитие эффекта проводимого лечения зависело не только от использования иммунотерапии, но и от исходных показателей иммунного статуса больных с ранним рецидивом и резистентной ЛХ, которые были связаны со степенью тяжести их клинического состояния и распространенностью процесса.

С целью подтверждения эффективности метода экстракорпоральной иммунотерапии на системном уровне было выполнено изучение интегративных критериев периферической крови. Анализ структуры общих неспецифических адаптационных реакций в крови больных до лечения выявил, что доминирующими типами реакций были реакции стрессорного типа (73%). На фоне лечения в контрольной группе также преобладали реакции острого и хронического стресса. Напротив, в основной группе после завершения лечения доля стрессорных реакций уменьшалась в 4 раза за счет доминирования нормотипов реакций тренировки и спокойной активации (80%). При использовании экстракорпоральной иммунотерапии по окончании лечения внутригрупповое соотношение между антистрессорными реакциями и стрессом возросло в 7,4 раз, а в контрольной группе снизилось в 1,4 раза по сравнению с исходным состоянием. В результате межгрупповые отличия соотношения стресс/антистресс изменились в 13,7 раз, что характеризует антистрессорное, адаптогенное влияние используемого при полихимиотерапии метода иммуномодуляции.

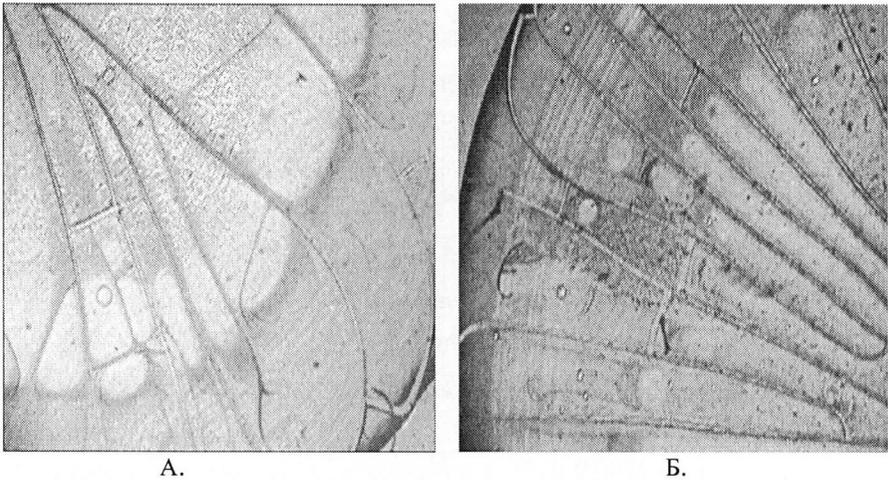
Изучение морфологической структуры сыворотки крови выявило, что у больных до лечения не идентифицировались нормотипы фаций, во всех случаях было установлено формирование патологических типов, которые характеризовались глубоким нарушением системного структуропостроения и накоплением патологических белков и токсинов (рис. 4 А, Б). На фоне стандартной полихимиотерапии в контрольной группе наблюдалось лишь частичное восстановление пространственной структуры I и II уровней самоорганизации, оставались преобладающими патологические типы. В то же время у больных основной группы после лечения выявлена выраженная направленность формирования нормотипов, восстановление круговых ауторитмов, радиальной и частично-радиальной симметрии трещин (рис. 5 А, Б).



**Рис. 4. Фрагменты фаций сыворотки крови больных до начала лечения. Ув.\*40**

**А – выявление патологических нормотипов (иррадиального);**

**Б – маркеры сопутствующих патологических процессов (языки Арнольда)**



**А.**

**Б.**

**Рис. 5. Структура фаций проведения ПХТ с иммунотерапией. Ув.\*40**

**Преобладание нормотипов с частично-радиальной (А) и радиальной симметрией (Б)**

Это говорит о выраженном модулирующем влиянии иммунотерапии на интегративные клеточные показатели лейкограммы и молекулярные системы крови в процессе фазового перехода из жидкого в твердотельное состояние.

В условиях аналитической ячейки процессы самоорганизации демонстрировали возможность комплементарного снижения онкогенных белковых молекул и образования анизоморфонов, структура которых была сопряжена с дегенеративно-дистрофической природой изменений опухолевого процесса. Маркером злокачественной патологии является агрегация макро- и микросферолитов с последующим выпадением микросферолита на этапах злокачественного роста с трансформацией макросферолита до этапа скелетирования. В основной группе такие маркеры, обнаруженные исходно, после лечения не выявлялись.

Таким образом, применение метода экстракорпоральной иммунотерапии у больных с первично-резистентным течением лимфомы Ходжкина и первым ранним рецидивом заболевания на фоне полихимиотерапии II линии имеет ряд существенных преимуществ, таких как более высокая частота достижения общего ответа на лечение при его низкой токсичности, улучшение иммунологических и интегративных показателей.

## **ВЫВОДЫ**

1. Определение оптимального режима инкубации лейкомаксы, полученной у больных с резистентным и рецидивным течением лимфомы Ходжкина, в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2 и интерферона- $\alpha 2b$ , показало, что наиболее эффективной является ее продолжительность 24 часа. Отмечено максимальное снижение доли лимфоцитов в ранней стадии апоптоза (в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2 с  $21,0 \pm 1,9\%$  до  $16,3 \pm 1,2\%$  ( $p \leq 0,05$ ), в присутствии интерферона- $\alpha$  с  $21,0 \pm 1,9\%$  до  $17,1 \pm 2,0\%$ ) на фоне тенденции к повышению темпа и индекса пролиферативной активности лимфоцитов в сравнении с исходным состоянием и другими изученными режимами.

2. Применение метода экстракорпоральной иммунотерапии в сочетании с полихимиотерапией II линии по схеме ДНАР в комплексном лечении больных с первично-резистентным течением лимфомы Ходжкина и первым ранним рецидивом заболевания ПВ-IVB стадий при сравнении со стандартной полихимиотерапией II линии по той же схеме достоверно увеличивает частоту общего ответа на лечение с 60% до 83,3% ( $p \leq 0,05$ ), снижает риск прогрессирования на фоне терапии с 13,3% до 3,4% и позволяет выполнить высокодозную химиотерапию с аутотрансплантацией стволовых клеток большему количеству пациентов (16,6% против 6,7%). Отмечена тенденция к улучшению двухлетней общей и безрецидивной выживаемости в группе больных, получавших иммунополихимиотерапию (64,7% против 60,9%).

3. Включение в схему лечения метода экстракорпоральной иммунотерапии способствовало снижению числа токсических осложнений лечения: лейкопении – 17,5% против 40% ( $p \leq 0,05$ ), диспептических явлений – 33,3% против 70,0% ( $p \leq 0,05$ ).

4. Метод экстракорпоральной иммунотерапии обеспечивает сохранность иммунной системы в условиях воздействия цитостатиков и приводит к двукратному уменьшению их проапоптотического воздействия на иммунокомпетентные клетки ( $16,7 \pm 4,25\%$  против  $29,0 \pm 4,37\%$ ,  $p \leq 0,05$ ), что позволяет обеспечить лучшую сохранность Т-клеточного звена иммунной системы у больных рецидивной и рефрактерной лимфомой Ходжкина по сравнению с больными, подвергшимися стандартной полихимиотерапии.

5. Установлено системное биоадаптивное влияние иммуномодифицированной химиотерапии рецидивов и рефрактерной лимфомы Ходжкина, заключающееся в увеличении формирования устойчивых нормотипов интегральных антистрессорных реакций, частота которых в 13,7 раза превысила показатели контроля.

6. Выявлены морфологические параллели между клеточным составом (маркер интегральной адаптационной реакции) и процессами самоорганизации

сыворотки крови, связанные с восстановлением параспецифических системных структурных признаков (трещин, отдельностей, конкреций) и проявлением дегенеративных изменений специфичных структурных онкомаркеров – анизотропных макро- и микросферолитов в аналитической ячейке.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Большим с ранним рецидивом или резистентной к терапии лимфомой Ходжкина мы рекомендуем включение в комплексное лечение на этапе проведения полихимиотерапии II линии экстракорпоральной иммунотерапии с использованием препаратов рекомбинантного интерлейкина-2 и интерферона –  $\alpha 2b$ .

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Стасенко Я.С. Клиническая эффективность экстракорпоральной иммунотерапии в комплексном лечении больных рефрактерным и рецидивным течением лимфомы Ходжкина / Я.С. Стасенко, В.А. Курбатова, Т.А. Снежко // 67-я Итоговая конференция молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета с международным участием. Материалы конференции (г. Ростов-на-Дону, 19 апреля 2013 г.) – С. 145.

2. Златник Е.Ю. Применение цитокиновых препаратов в комплексном лечении больных с рецидивами и рефрактерной лимфомой Ходжкина / Е.Ю. Златник, Т.А. Снежко, И.Б. Лысенко, Н.Д. Ушакова, Н.В. Николаева, И.А. Новикова, А.В. Бахтин // Труды Международного форума «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (14-17 мая 2014 г., г. Казань). – С. 87-89.

3. T. A. Snezhko, I. B. Lysenko, E. Yu. Zlatnik, N. D. Ushakova, L.Yu. Vladimirova, I.A. Novikova, A.V. Bahtin, O.N. Selutina The immune status and apoptosis in lymphocytes in patients with refractory Hodgkin's lymphoma. ASCO Annual Meeting May 30 – 2014; published on Meeting Library (<http://meetinglibrary.asco.org>)

4. Златник Е.Ю. Эффективность применения цитокиновых препаратов при полихимиотерапии у больных с рецидивами и рефрактерной лимфомой Ходжкина./ Е.Ю. Златник, И.Б. Лысенко, Т.А. Снежко, Н.Д. Ушакова, И.А. Новикова, А.В. Бахтин // Материалы Юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии, биотехнологии и цитокиновой регуляции», посвященной 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России (Санкт-Петербург, 25-27 июня 2014 г.). Цитокины и Воспаление. – 2014. – № 1. – Т.13. – С. 96.

5. Снежко Т.А. Экстракорпоральная иммунотерапия в комплексном лечении больных с рефрактерным и рецидивным течением лимфомы Ходжкина. / Т.А. Снежко, И.Б. Лысенко, Н.Д. Ушакова, И.А. Новикова, Л.Ю. Владимирова, Е.Ю. Златник, Н.В. Николаева, Е.А. Капуза, К.А. Новоселова // Тезисы VIII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии (Казань, 16-18 сентября 2014 г.). Евразийский онкологический журнал. – 2014. – №3 (03) – С. 935.

6. Снежко Т.А. Иммунный статус больных с рефрактерным течением и рецидивами лимфомы Ходжкина / Т.А. Снежко, И.Б. Лысенко, Е.Ю. Златник, Н.Д. Ушакова, И.А. Новикова, Л.Ю. Владимирова, К.А. Новоселова // Гематология и трансфузиология. 2014. – Т. 59. – №S1. – С. 120 – 121.

7. Лысенко И.Б. Динамика иммунного статуса у больных с рецидивами и рефрактерной лимфомой Ходжкина при различных режимах терапии / И.Б. Лысенко, Т.А. Снежко, Е.Ю. Златник, Н.В. Николаева, Н.Д. Ушакова, И.А. Новикова, К.А. Новоселова // Сборник материалов научно-практической конференции гематологов Южного и Северо-Кавказского федеральных округов «Оптимизация диагностики и лечения заболеваний системы крови» (28–29 ноября 2014 г., г. Ростов-на-Дону). – РостГМУ, 2014 г. – С. 5 – 6.

8. Снежко Т.А. Определение оптимальных режимов обработки клеток аутолейкомассы при проведении экстракорпоральной противоопухолевой

терапии рекомбинантным интерлейкином – 2 у больных лимфомой Ходжкина / Т.А. Снежко, И.Б. Лысенко, И.А. Новикова, Н.Д. Ушакова // *Фундаментальные исследования: материалы Всероссийской конференции молодых ученых (Ростов-на-Дону, 17 апреля 2015 г.)*. Ростов-на-Дону. – Новочеркасск: Лик, 2015. – С. 43 – 44.

9. Снежко Т.А. Динамика общих неспецифических адаптационных реакций на фоне иммунополихимиотерапии рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина / Т.А. Снежко, А.И. Шихлярова, И.Б. Лысенко, Л.Ю. Владимирова // 1-й Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи 2015». Сборник тезисов. М., 2015. – С.176.

10. Снежко Т.А. Эффективность экстракорпоральной иммунотерапии в комплексном лечении больных с рецидивами и резистентной формой лимфомы Ходжкина / Т.А. Снежко, И.Б. Лысенко, Н.Д. Ушакова, Е.Ю. Златник, Л.Ю. Владимирова, И.А. Новикова, Н.В. Николаева, Т.Ф. Пушкарева, К.А. Новоселова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/123-17858>

11. Снежко Т.А. Динамика интегративных показателей периферической крови на фоне иммунополихимиотерапии рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина / Т.А. Снежко, А.И. Шихлярова, И.Б. Лысенко, Л.Ю. Владимирова, Т.А. Куркина, Т.П. Протасова, Е.П. Коробейникова, К.А. Новоселова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 3; URL: <http://www.science-education.ru/123-19896>

**ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

Г-КСФ - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФН- $\alpha$  - интерферон- $\alpha$

ЛХ – Лимфома Ходжкина

ПХТ – полихимиотерапия

РИЛ-2 – рекомбинантный интерлейкин-2

РНИОИ – Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

ЭИТ – экстракорпоральная иммунотерапия

EFS - Event-free survival

НК-клетки – натуральные киллеры

OS - Overall survival

---

Печать цифровая. Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс».

Формат 60x84/16. Объем 1.0 уч.-изд.-л.

Заказ № 4074. Тираж 100 экз.

Отпечатано в КМЦ «КОПИЦЕНТР»

344006, г. Ростов-на-Дону, ул. Суворова, 19, тел. 247-34-88

---