

А.Ф. Лазарев¹, Д.К. Кенбаева², Р.К. Медеубаев³, А.Е. Горбатенко⁴, С.З. Танатаров⁴

¹ Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул, Российская Федерация

² Городской онкологический диспансер г. Астаны, Республика Казахстан

³ Медицинский университет «Астана», Республика Казахстан

⁴ Государственный медицинский университет г. Семей, Республика Казахстан

Влияние иммунотерапии на клеточное звено иммунитета при раке шейки матки

Иммунотерапия в течение последних 30 лет стала неотъемлемым компонентом лечения ряда злокачественных новообразований. Наиболее эффективным подходом в этом плане могло бы стать использование комплекса иммуностимулирующих факторов, включающего опухолевый антиген в той или иной форме, и интерлейкины, стимулирующие дифференцировку. **Цель исследования:** сравнить показатели клеточного звена иммунной системы при специфической и сочетанной иммунотерапии больных раком шейки матки. **Пациенты и методы:** в исследование были включены 76 пациенток с раком шейки матки, проходившие сочетанную лучевую терапию. На фоне лучевого лечения была осуществлена иммунотерапия в двух вариантах: реинфузия аутолимфоцитов, подвергавшихся инкубации *in vitro* с опухолевым антигеном (гомогенат опухолевой ткани) и интерлейкином 2, и вышеуказанный метод иммунотерапии, дополненный препаратом интерлейкина 2 и средством из группы системных энзимов. **Результаты:** использование иммунотерапии привело к превышению показателей клеточного звена иммунной системы в основной группе при сочетанной иммунотерапии, превышению содержания клеток с киллерной активностью, обеспечивающих эффективный противоопухолевый иммунный ответ, и, соответственно, улучшению клинической эффективности применения методов специфической и адаптивной иммунотерапии у больных со злокачественными новообразованиями шейки матки. **Выводы:** возможно использование иммунотерапии в виде препарата интерлейкина 2 и системной энзимотерапии в сочетании со специфической иммунотерапией. Этот способ лечения показан при снижении показателей клеточного звена иммунной системы.

Ключевые слова: рак шейки матки, специфическая иммунотерапия, адаптивная иммунотерапия, интерлейкин 2, системные энзимы. (Вестник РАМН. 2014; 3–4: 5–8)

5

Введение

Иммунотерапия в течение последних 30 лет стала неотъемлемым компонентом лечения ряда злокачественных новообразований. В то же время весь комплекс разработанных способов и подходов до настоящего времени не обеспечивает достаточного лечебного эффекта в отношении большого числа форм новообразований [1, 2]. Лишь в минимальной степени проведены экспериментальные и клинические исследования по иммунотерапии рака

шейки матки (РШМ) [3], а в Республике Казахстан это направление не развивалось вовсе.

Субъектом иммунотерапии, осуществляемой в любых формах и вариантах, остаются иммунокомпетентные клетки, обладающие киллерной и хелперной активностью [4, 5]. Методы воздействия на них предусматривают активацию с помощью вакцин, факторов межклеточного взаимодействия, других ауто- и аллогенных стимуляторов пролиферации, дифференцировки, физических факторов и т.д. [6, 7]. Вероятно, наиболее эффективным подходом

A.F. Lazarev¹, D.K. Kenbayeva², R.K. Medeubayev³, A.E. Gorbatenko⁴, S.Z. Tanatarov⁴

¹ Altai Regional Oncological Clinic, Barnaul, Russian Federation

² City Oncological Clinic of Astana, Republic of Kazakhstan

³ Astana Medical University, Republic of Kazakhstan

⁴ Semey State Medical University, Republic of Kazakhstan

Effect of Immunotherapy On the Cellular Immunity In Patients With Cervical Cancer

For the last thirty years immunotherapy has become an integral part of treatment of some cancers. The most effective approach in this context would be the use of complex immunostimulatory factors including tumor antigen in different forms, interleukins that stimulate differentiation. **Background:** The aim of the study was to compare cellular immune response on specific and combined immunotherapy in patients with cervical cancer. **Patients and methods:** 76 cervical cancer patients undergoing combined radiotherapy were included into the study. Plus to basic radiation treatment two types of immunotherapy was performed: first — autolympocytes reinfusion after *in vitro* incubation with tumor antigen (tumor tissue homogenate) and interleukin-2, second — combination of above mentioned immunotherapy, interleukin-2 and systemic enzyme. **Results:** This has resulted in increase of cellular immunity parameters in the main group with combined immunotherapy an excess of cells with killer activity to ensure an effective anti-tumor immune response and, accordingly, the clinical efficacy of specific methods and adoptive immunotherapy in patients with cervical cancer. **Conclusion:** Immunotherapy usage in the form of a preparation of interleukin-2 and a system enzymotherapy in a combination with a specific immunotherapy is possible. This way of treatment is recommended in cases of decreasing of cellular immunity indicators.

Key words: cervical cancer, immunotherapy, specific immunotherapy, adoptive immunotherapy, interleukin-2, systemic enzymes. (Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 3–4: 5–8)

в этом плане могло бы являться использование комплекса иммуностимулирующих факторов, включающего опухолевый антиген в той или иной форме, интерлейкины, стимулирующие дифференцировку [6, 8]. Причем применение последнего подхода оправдано как при использовании версии ЛАК-терапии со стимуляцией *in vitro*, так при системном введении цитокинов.

Дополнительная активация неспецифических механизмов иммунитета, повышение доступности опухолевых антигенов за счет увеличения протеолитической активности сыворотки крови также считаются перспективными и адекватными направлениями в комплексной иммунотерапии.

Цель исследования: сравнить показатели клеточного звена иммунной системы при специфической и сочетанной иммунотерапии больных РШМ.

Пациенты и методы

Участники исследования

В клинических условиях (региональный онкологический диспансер г. Семей, городской онкологический диспансер г. Астаны, Республика Казахстан; Алтайский краевой онкологический диспансер г. Барнаула, Российская Федерация) обследованы 76 пациенток с РШМ, проходивших консервативное (базисное) лечение (сочетанная лучевая терапия, СЛТ). На фоне лучевой терапии осуществлена иммунотерапия в двух вариантах. Первый (группа сравнения) предусматривал реинфузию аутолимфоцитов, подвергавшихся инкубации *in vitro* с опухолевым антигеном (гомогенат опухолевой ткани) и интерлейкином 2. При втором варианте (основная группа) лечения вышеуказанный метод иммунотерапии был дополнен системным применением препарата интерлейкина 2 и средств из группы системных энзимов.

В группу сравнения были включены 40 пациенток — по 20 с IIВ ($T_{26}N_0M_0$) и III стадией ($T_{1-2}N_1M_0$, $T_3N_{0-1}M_0$), получавших сочетанную лучевую и специфическую иммунотерапию (СИТ). В основную группу были включены 19 и 17 больных, получавших СЛТ, СИТ и адаптивную иммунотерапию (АИТ).

Критерии включения больных в исследование предусматривали:

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

Критерии исключения:

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

Методы исследования

Методом проточной цитометрии с использованием оборудования и диагностикумов Beckman Coulter (США) с использованием реагентов производителя определяли

общее число Т лимфоцитов и их содержание в зависимости от кластеров дифференцировки: CD3⁺ — зрелые Т лимфоциты; CD3⁺CD4⁺ — Т хелперы; CD3⁺CD56⁺CD16⁺ — естественные киллеры; CD3⁺CD56⁺CD16⁺ — Т киллеры.

СИТ проводили следующим образом. Производился забор 50 мл нативной венозной крови пациента. Для предотвращения свертывания непосредственно после взятия в кровь добавляли гепарин. Выделение лейкоцитов осуществляли из крови путем центрифугирования на градиенте фиколл-верографин ($\rho = 1,076$), раздельно, в 5 пробирках по 10 мл. Полученные на градиенте лейкоциты снимали пипеткой и переносили в общую пробирку с питательной средой (раствор Хенкса или среда 199), затем повторно выделяли на аналогичном градиенте плотности в одной пробирке. Снятые с градиента плотности лейкоциты ресуспендировали в питательной среде объемом 10 мл. В среду добавляли 10 000 МЕ препарата интерлейкина 2 (0,01 мг) и проводили инкубацию в термостате при 37 °С в течение 6 ч.

Биопсийный материал злокачественного новообразования в объеме 2–3 мл разводили в 10 мл дистиллированной воды и гомогенизировали ультразвуковым гомогенизатором (мощность 500 Вт; Cole Parmer, США) в течение 15 мин, что гарантировало полное разрушение клеточных элементов при сохранении основных белковых антигенных детерминант. Для исключения попадания неразрушенных клеток в среду инкубации и далее в организм материал подвергали фильтрации (фильтры NucleoSpin, Macherey-Nagel, Германия) с последующим осаждением на ультрацентрифуге (10 000 g в течение 10 мин).

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

В АИТ применяли препарат системной энзимотерапии по схеме: 5 таблеток 3 раза/сут в течение 3 сут, 4 таблетки 3 раза/сут в течение 7 сут (доза насыщения) и далее по 3 таблетки 3 раза/сут до 1 мес и препарат интерлейкина 2 в дозе 200 000–250 000 МЕ/кг в течение 4 нед, через 2 сут, внутривенно капельно в 400 мл физиологического раствора (продолжительность инфузии 4 ч) при пребывании пациентов в условиях стационара, либо в той же дозе подкожно в 2 мл физиологического раствора (при лечении в амбулаторных условиях). Применение методики иммунотерапии было одобрено решением Этической комиссии научно-клинического отдела государственного медицинского университета г. Семей (№ 76 от 20.05.2009) и Этического комитета АО «Медицинский университет «Астана»» (№ 12 от 17.03.2010).

Статистическая обработка данных

При анализе клинических данных использовали параметрические и непараметрические методы. Сравнение количественных признаков проводили при помощи критерия Стьюдента. Ограничения использования данного метода включали анализ распределения по критерию Колмогорова–Смирнова, а также несоблюдение равенства дисперсий числовых рядов. При несоблюдении критериев применимости параметрических методов применяли непараметрический метод анализа в независимых выборках по U-критерию Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных раком шейки матки ПВ-стадии при проведении иммунотерапии

Показатели	Контрольная группа (n =45)	Больные раком шейки матки ПВ-стадии	
		Группа сравнения (n =20)	Основная группа (n =19)
Лимфоциты общ., ×10 ⁹ /л	2,10±0,09	1,93±0,09	2,12±0,09
CD3+, ×10 ⁹ /л	1,45±0,06	1,14±0,05*	1,37±0,06 [#]
CD3+, %	69,0±2,4	59,1±2,3*	64,6±2,5
CD3+CD4+, ×10 ⁹ /л	0,89±0,05	0,81±0,05	0,94±0,05
CD3+CD4+, %	42,4±1,9	42,0±2,1	44,3±2,1
CD3-CD56+CD16+, ×10 ⁹ /л	0,17±0,01	0,15±0,01	0,20±0,01**
CD3-CD56+CD16+, %	8,1±0,5	7,8±0,5	9,4±0,5
CD3+CD56+CD16+, ×10 ⁹ /л	0,11±0,01	0,07±0,01*	0,10±0,01 [#]
CD3+CD56+CD16+, %	5,3±0,4	3,7±0,3*	4,7±0,3 [#]

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с показателем контрольной группы (p <0,05), [#] — различия статистически значимы по сравнению с показателем группы сравнения (p <0,05).

Таблица 2. Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных раком шейки матки III стадии при проведении иммунотерапии

Показатели	Контрольная группа (n =45)	Больные раком шейки матки III стадии	
		Группа сравнения (n =20)	Основная группа (n =17)
Лимфоциты общ., ×10 ⁹ /л	2,10±0,09	1,57±0,09*	1,95±0,09 [#]
CD3+, ×10 ⁹ /л	1,45±0,06	1,08±0,06*	1,41±0,06 [#]
CD3+, %	69,0±2,4	68,8±3,1	72,3±2,9
CD3+CD4+, ×10 ⁹ /л	0,89±0,05	0,73±0,05*	0,88±0,05 [#]
CD3+CD4+, %	42,4±1,9	46,5±2,7	45,1±2,4
CD3-CD56+CD16+, ×10 ⁹ /л	0,17±0,01	0,10±0,01**	0,15±0,01 [#]
CD3-CD56+CD16+, %	8,1±0,5	6,4±0,5*	7,7±0,4
CD3+CD56+CD16+, ×10 ⁹ /л	0,11±0,01	0,06±0,01*	0,10±0,01 [#]
CD3+CD56+CD16+, %	5,3±0,4	3,9±0,2*	5,1±0,3 [#]

Примечание. * — различия статистически значимы по сравнению с показателем контрольной группы (p <0,05), ** — различия статистически значимы по сравнению с показателем контрольной группы (p <0,01), [#] — различия статистически значимы по сравнению с показателем группы сравнения (p <0,05).

Результаты

Основные результаты иммунотерапии представлены в табл. 1 и 2. В основной группе и группе сравнения не обнаружено существенных различий между показателями содержания общих лимфоцитов. Не зарегистрировано существенных различий с контрольной группой по абсолютному содержанию в крови CD3+-клеток, причем данный показатель был выше в основной группе по отношению к группе сравнения на 20,2% (p <0,05). По относительному содержанию CD3+-клеток значимых различий между группами не зафиксировано. Абсолютное число и относительное содержание CD3+CD4+-клеток в группе СИТ + АИТ незначимо превысило как показатели группы СИТ, так и контрольные значения.

Выявлено значимое превышение содержания естественных киллеров над данными, полученными в группе СЛТ + СИТ: на 33,3 и 20,9%, соответственно (в обоих случаях p <0,05). Также полностью нормализовалось абсолютное и практически полностью — относительное содержание Т киллеров за счет превышения над показателями группы СИТ на 42,9 и 27,5%, соответственно (в обоих случаях p <0,05). Содержание общих лимфоцитов в крови больных основной группы не имело значимых различий с контролем и на 24,2% превышало показатель группы сравнения (p <0,05). Имелось также значимое превышение числа CD3+ над показателем группы сравнения (на 30,6%; p <0,05). По относитель-

ной величине их содержания различий между группами не было.

В результате проведения сочетанной иммунотерапии наблюдали полную нормализацию содержания в крови Т лимфоцитов-хелперов. Превышение над группой сравнения по абсолютному показателю было статистически значимым и составило 20,9% (p <0,05). Более выраженное, чем в группе больных РШМ ПВ-стадии, снижение абсолютного и относительного числа натуральных киллеров обусловило значимое различие по данному показателю между группами обследованных больных. Так, степень превышения по абсолютной величине составила 49,7% (p <0,05), значимых различий с контролем не наблюдалось. По относительному содержанию CD3-CD56+CD16+-клеток превышение над группой сравнения составило 20,2% (p >0,05). Как по абсолютному, так и по относительному содержанию CD3+CD56+CD16+-клеток в основной группе различий с контролем не было, и наблюдалось значимое превышение над группой сравнения (на 66,7 и 31,5%, в обоих случаях p <0,05).

В табл. 3 представлены данные по трехлетней выживаемости обследованных больных в целом по всем группам в зависимости от стадии и проведенного лечения. Анализ показал наличие корреляций между выживаемостью и видом терапии. Имело место превышение трехлетней выживаемости по отношению к группе сравнения при ПВ-стадии на 9,7%, при III стадии — на 13,2%.

Таблица 3. Анализ трехлетней выживаемости больных обследованных групп в зависимости от проведенного лечения

Стадия рака	Схема лечения	Число выживших, n (%)
Рак шейки матки IIВ-стадии	СЛТ + СИТ (n =20)	17 (85,0%)
	СЛТ + СИТ + АИТ (n =19)	18 (94,7%)
Рак шейки матки III стадии	СЛТ + СИТ (n =20)	15 (75,0%)
	СЛТ + СИТ + АИТ (n =17)	15 (88,2%)

Обсуждение

Проведение специфической клеточной иммунотерапии больным злокачественными новообразованиями, подвергающимся или подвергавшимся ранее воздействию специфической противоопухолевой терапии (химио-, лучевой), может оказаться чрезвычайно важным. Негативное воздействие специфической противоопухолевой терапии проявляется не только в отношении новообразования, но и клеточного звена иммунной системы: зарегистрировано снижение численных и функциональных показателей иммунокомпетентных клеток также и в ряде исследований их состояния при нелеченых злокачественных опухолях [9].

Однако мы полагаем, что специфическая клеточная иммунотерапия может быть особенно успешна именно при повреждении опухоли во время курсов противоопухолевого лечения. Одним из возможных подходов к улучшению ее результатов может стать применение средств, стимулирующих клеточный иммунитет и защищающих иммунокомпетентные клетки от воздействия негативных

факторов химио- и лучевой терапии. В качестве таковых предложены препарат интерлейкина 2 и системная энзимотерапия, результаты применения которых при одной из распространенных форм опухолей женской репродуктивной системы представлены в данной статье.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о значимом по ряду показателей превышении результатов коррекции нарушений со стороны клеточного звена иммунной системы в основной группе при сочетанной иммунотерапии. В особенности обращает на себя внимание превышение содержания клеток с киллерной активностью, обеспечивающих эффективный противоопухолевый иммунный ответ. В целом проведенный анализ четко свидетельствует о клинической эффективности применения методов специфической и адаптивной иммунотерапии у больных со злокачественными новообразованиями шейки матки.

8

ЛИТЕРАТУРА

1. Harada Y., Yonemitsu Y. New technologies for immunotherapy against cancer: development of cell expansion technology and viruses as immune boosters. *Yakugaku Zasshi*. 2010; 130 (11): 1519–1526.
2. Yaguchi T., Sumimoto H., Kudo-Saito C., Tsukamoto N., Ueda R., Iwata-Kajihara T., Nishio H., Kawamura N., Kawakami Y. The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int. J. Hematol.* 2011; 93 (3): 294–300.
3. Su J.H., Wu A., Scotney E. Ma B., Monie A., Hung C.F., Wu T.C. Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential. *BioDrugs*. 2010; 24 (2): 109–129.
4. Iga-Murahashi M., Hijikata Y., Suehiro Y., Inoue H., Tanaka Y., Shimoda S., Marumoto T., Okazai T., Yoshida K., Tsunoda T., Tani K. New strategies in anti-tumor immunotherapy. *Rinsho Ketsueki*. 2010; 51 (11): 1654–1660.
5. Hamdy S., Haddadi A., Ghotbi Z., Hung R.W., Lavasanifar A. Part I: targeted particles for cancer immunotherapy. *Curr. Drug Deliv.* 2011; 8 (3): 261–273.
6. O’Neill D.W. Dendritic cells and T cells in immunotherapy. *J. Drugs Dermatol.* 2010; 9 (11): 1383–1392.
7. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331 (6024): 1565–1570.
8. Onishi H., Suzuki H., Chikazawa N., Morisaki T., Katano M. New immunotherapy against cancer: a therapy to control regulatory T cell. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2010; 101 (10): 207–214.
9. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Danna E.A., Miller S., Davis C., Dissanayake S.K. Antagonists of tumor-specific immunity: tumor-induced immune suppression and host genes that co-opt the anti-tumor immune response. *Breast Dis.* 2004; 20: 127–135.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лазарев Александр Федорович, доктор медицинских наук, профессор, директор Алтайского филиала ГУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Адрес: 656000, Барнаул, ул. Никитина, д. 77, тел.: (385) 263-26-20, e-mail: aoc@ab.ru

Кенбаева Динара Кумаровна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением гинекологии Городского онкологического диспансера г. Астаны

Адрес: 010000, Астана, ул. Манаса, д. 17, тел.: (717) 254-20-30, e-mail: dikenb@mail.ru

Медеубаев Рустем Калимович, доктор медицинских наук заведующий курсом онкологии факультета усовершенствования врачей АО «Медицинский университет Астана»

Адрес: 010000, Астана, ул. Бейбитшилик, д. 53, тел.: (717) 253-94-55, e-mail: rustemed@mail.ru

Горбатенко Андрей Евгеньевич, ассистент кафедры специальных дисциплин Государственного медицинского университета г. Семей

Адрес: 071400, Семей, ул. Абая Кунанбаева, д. 103, тел.: (717) 256-42-09, e-mail: aegorbat@mail.ru

Танатаров Саят Заманбекович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры специальных дисциплин Государственного медицинского университета г. Семей

Адрес: 071400, Семей, ул. Абая Кунанбаева, д. 103, тел.: (717) 256-42-09, e-mail: sayat68@mail.ru