

УДК 618.146-006.6:615.37

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Д.К. Кенбаева, А.Ф. Лазарев

Проведен анализ содержания лимфоцитов различных кластеров дифференцировки в крови. В качестве метода иммунотерапии рассмотрена реинфузия лимфоцитов активированных *in vitro* препаратом интерлейкина-2 и инкубированных с опухолевым антигеном.

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

Клеточное звено системы иммунитета представляет собой важнейший компонент противоопухолевой резистентности организма [1, 2], включающий системы распознавания, запоминания, презентации и элиминации опухолевых антигенов. Его влияние на развившееся злокачественное новообразование, тем не менее, обычно оказывается недостаточным для подавления опухолевого роста. Это объясняется наличием множества причин – включая отсутствие распознаваемого чужеродного генетического материала или его маскировку [3], подавление различных механизмов клеточного звена (от пролиферации и дифференцировки клеток до метаболизма) за счет так называемой опухолевой интоксикации, продукции тканями новообразования гуморальных факторов, подавляющих иммунную реактивность, а также в результате использования методов специфической противоопухолевой терапии [4].

В результате оказывается, что в момент максимальной уязвимости опухоли для иммунных механизмов они являются наименее способными к обеспечению элиминации клеток новообразования.

Иммунотерапия опухолей как основной метод лечения применяется на протяжении многих десятилетий и позволяет добиться значительного улучшения клинических исходов [5]. Однако не во всех случаях иммунотерапия как изолированный метод может обеспечивать адекватный результат. По мнению некоторых исследователей, разделяемому и нами, иммуногенность опухоли, недостаточная или даже отсутствующая для активной иммунотерапии может существенно возрастать в результате повреждения ее тканей в ходе лучевого или химиотерапевтического лечения [6].

Исходя из этого положения, нами была разработана методика комплексного лечения рака шейки

матки, включающая специфическую и неспецифическую стимуляцию клеточных механизмов иммунной системы *in vitro* с последующим применением стимулированных клеток в качестве средства специфической иммунотерапии на фоне лучевого лечения рака шейки матки IIВ–III стадии.

Цель исследования – определение влияния разработанного способа иммунотерапии на состояние клеточного звена системы иммунитета у больных раком шейки матки IIВ–III стадии.

Материалы и методы. Осуществлено комплексное клиничко-иммунологическое обследование 81 больной РШМ, в том числе 41 – с IIВ и 40 – с III клинической стадией (*далее* – ст.), в возрасте от 39 до 65 лет, средний возраст по группе IIВ ст. – $49,2 \pm 1,4$ года, по группе III ст. – $50,5 \pm 1,6$ года.

Определялись показатели клеточного иммунитета и содержание цитокинов в крови в динамике комплексного лечения, включающего применение сочетанной лучевой терапии (СЛТ) у всех обследованных больных, и разработанной методики специфической иммунотерапии (СИТ), основанной на реинфузии аутогенных лимфоцитов, инкубированных с гомогенатом опухолевой ткани и интерлейкином-2 у 40 пациенток, в том числе 20 – с IIВ и 20 – с III ст. РШМ. Контрольную группу составили 45 практически здоровых женщин, репрезентативных основной группе по возрасту.

Осуществлено иммунотипирование следующих форм иммуноцитов: CD3+ – зрелые Т-лимфоциты (диагностикум Beckman Coulter, №A07746); CD3+CD4+ – Т-хелперы (№A07750); CD3+CD8+ – Т-супрессоры и киллеры (№A07757); CD3–CD56+CD16+ – натуральные киллеры (№A07735); CD3+CD56+CD16+ – НКТ-клетки (№A07415); CD4+CD25+ – CD4+ лимфоциты на ранней стадии

Таблица 1 – Динамика показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ ПВ ст. при СИТ и СЛТ

Показатель	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ ПВ ст.		P1	P2	P3
		СЛТ, n=21	СЛТ+СИТ, n=20			
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,51 \pm 0,31	3,93 \pm 0,23	4,25 \pm 0,23	<0,01	<0,01	>0,05
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,10 \pm 0,09	1,70 \pm 0,09	1,93 \pm 0,09	<0,05	>0,05	>0,05
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	1,45 \pm 0,06	1,08 \pm 0,05	1,14 \pm 0,05	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+, %	69,0 \pm 2,4	63,5 \pm 2,7	59,1 \pm 2,3	>0,05	<0,05	>0,05
CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,89 \pm 0,05	0,76 \pm 0,05	0,81 \pm 0,05	>0,05	>0,05	>0,05
CD3+CD4+, %	42,4 \pm 1,9	44,7 \pm 2,4	42,0 \pm 2,1	>0,05	>0,05	>0,05
CD3+CD8+, $\times 10^9/\text{л}$	0,39 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	>0,05	<0,05	>0,05
CD3+CD8+, %	18,6 \pm 1,1	20,6 \pm 1,5	17,1 \pm 1,2	>0,05	>0,05	>0,05
CD3-CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,17 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	<0,05	>0,05	<0,05
CD3-CD56+CD16+, %	8,1 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	7,8 \pm 0,5	<0,05	>0,05	>0,05
CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,11 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+CD56+CD16+, %	5,3 \pm 0,4	3,5 \pm 0,2	3,7 \pm 0,3	<0,05	<0,05	>0,05
CD4+CD25+, $\times 10^9/\text{л}$	0,21 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	<0,05	<0,05	>0,05
CD4+CD25+, %	10,0 \pm 0,6	8,2 \pm 0,6	8,3 \pm 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD95+, $\times 10^9/\text{л}$	0,91 \pm 0,07	1,08 \pm 0,07	1,05 \pm 0,08	>0,05	>0,05	>0,05
CD95+, %	45,3 \pm 2,3	63,8 \pm 4,4	54,4 \pm 4,1	<0,05	>0,05	>0,05

Примечание: P1 – статистическая значимость различий больных с контролем в группе сравнения; P2 – статистическая значимость с контролем в основной группе, P3 – статистическая значимость различий показателей между группами больных в зависимости от лечения.

активации (№IM3486U); CD95+ – преапоптотические лейкоциты (№IM1504).

Статистическая обработка. При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Численные величины представлены в виде средних арифметических значений и ошибки среднего ($M \pm m$). Сравнение количественных признаков проводилось с помощью критерия Стьюдента, для непрерывных переменных – парного критерия Стьюдента. Ограничения использования параметрических методов включали анализ распределения по критерию Колмогорова – Смирнова, а также критерий равенства дисперсий. При несоблюдении граничных критериев применимости параметрических методов использованы непараметрические методы анализа – в независимых выборках – по критерию Манна – Уитни, в динамике наблюдения – по критерию Вилкоксона. В ходе анализа наличие возможности применения параметрического критерия статистической значимости исключало дальнейшее использование непараметрических критериев. В качестве граничного критерия опровержения нулевой гипотезы принимали $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты применения специфической иммунотерапии после лучевой терапии у больных РШМ ПВ ст. представлены в таблице 1.

У больных РШМ ПВ клинической стадии была зарегистрирована лишь тенденция к превышению числа лейкоцитов в группе СЛТ+СИТ над группой СЛТ, не имеющая статистической значимости. Сохранялось значимое относительное снижение данного показателя в сравнении с контролем.

Абсолютное содержание лимфоцитов в крови больных в группе СЛТ+СИТ превышало таковое в группе СЛТ и не имело статистически значимых различий с контролем.

Несмотря на наличие умеренной тенденции к превышению числа Т-лимфоцитов у больных группы СЛТ+СИТ, их абсолютное и относительное содержание оставалось ниже показателя контрольной группы (на 21,4 и 14,5% соответственно, $p < 0,05$ в обоих случаях).

Содержание CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток не имело в данной группе больных существенных различий с контролем по абсолютному и относительному показателям.

Анализ содержания в крови CD3-CD56+CD16+ клеток (натуральных киллеров) при проведении СЛТ определил статистически значимое снижение в сравнении с контролем как по абсолютному, так и по относительному показателю. В то же время при проведении СИТ оба параметра не имели значимых различий с контролем, а абсолютное содержание превышало показатель группы СЛТ (на 36,4%, $p < 0,05$).

Таблица 2 – Динамика показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ III ст. при проведении СИТ после лучевой терапии

Показатель	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ III ст.		P1	P2	P3
		СЛТ, n=20	СЛТ+СИТ, n=20			
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,51 \pm 0,31	3,68 \pm 0,26	3,97 \pm 0,25	<0,01	<0,01	>0,05
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,10 \pm 0,09	1,53 \pm 0,10	1,57 \pm 0,09	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	1,45 \pm 0,06	1,02 \pm 0,06	1,08 \pm 0,06	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+, %	69,0 \pm 2,4	66,7 \pm 3,4	68,8 \pm 3,1	>0,05	>0,05	>0,05
CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,89 \pm 0,05	0,69 \pm 0,06	0,73 \pm 0,05	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+CD4+, %	42,4 \pm 1,9	45,1 \pm 3,0	46,5 \pm 2,7	>0,05	>0,05	>0,05
CD3+CD8+, $\times 10^9/\text{л}$	0,39 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+CD8+, %	18,6 \pm 1,1	20,9 \pm 1,8	19,1 \pm 1,5	>0,05	>0,05	>0,05
CD3-CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,17 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	<0,01	<0,01	>0,05
CD3-CD56+CD16+, %	8,1 \pm 0,5	5,2 \pm 0,4	6,4 \pm 0,5	<0,05	<0,05	>0,05
CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,11 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	<0,01	<0,05	>0,05
CD3+CD56+CD16+, %	5,3 \pm 0,4	2,5 \pm 0,1	3,9 \pm 0,2	<0,01	<0,05	<0,01
CD4+CD25+, $\times 10^9/\text{л}$	0,21 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	<0,01	<0,01	>0,05
CD4+CD25+, %	10,0 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	7,6 \pm 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD95+, $\times 10^9/\text{л}$	0,91 \pm 0,07	1,15 \pm 0,07	1,17 \pm 0,06	<0,05	<0,05	>0,05
CD95+, %	45,3 \pm 2,3	75,4 \pm 4,3	74,3 \pm 3,9	<0,01	<0,01	>0,05

Примечание: P1 – статистическая значимость различий больных с контролем в группе сравнения; P2 – статистическая значимость с контролем в основной группе; P3 – статистическая значимость различий показателей между группами больных в зависимости от лечения.

Превышение числа НКТ-клеток (CD3+CD56+CD16+) в группе СЛТ+СИТ над показателем группы СЛТ не имело статистической значимости, а различия с контролем в обеих группах больных оставались весьма значительными (на 36,7 и 30,2 % соответственно, $p < 0,05$).

Различия между группами СЛТ и СЛТ+СИТ по показателям содержания CD4+CD25+ клеток не были статистически значимыми, и сохранялись достоверно более низкие их величины в сравнении со средними показателями контроля, хотя отмечалась тенденция к превышению числа активированных лимфоцитов данного кластера при проведении иммунотерапии и к относительному снижению – по содержанию преапоптотических клеток (CD95+).

При иммунологическом обследовании больных РШМ III ст. были получены данные, представленные в таблице 2.

Содержание лейкоцитов в крови у больных обеих клинических групп было статистически значимо сниженным по отношению к контролю ($p < 0,01$), как и абсолютного числа лимфоцитов.

Аналогичные показатели были характерны для абсолютного и относительного содержания CD3+ клеток. По первому из них имелось значи-

мое снижение по отношению к контролю, по второму – различий зарегистрировано не было.

Отмечалось незначимое превышение содержания CD3+CD4+ клеток в группе проведения СИТ, хотя имелись и различия с контролем (снижение на 18,0 %, $p < 0,05$).

По абсолютному содержанию натуральных киллеров превышение у больных, получавших иммунотерапию, над группой СЛТ составило 20,9 %, по относительному – 24,3 %. Однако в обоих случаях показатели были ниже, чем у здоровых лиц ($p < 0,01$, $p < 0,05$).

Имелось превышение содержания НКТ-клеток в группе СЛТ+СИТ над больными, у которых проводилась только СЛТ. Тем не менее, различия с контролем в основной группе были статистически значимыми (на 45,5 %, $p < 0,05$). По относительной величине данного показателя, напротив, выявлен рост на 56,0 % ($p < 0,01$), а различия с группой контроля составили 26,4 % ($p < 0,05$).

Также не отмечалось существенной динамики в отношении уровня активированных CD4+ клеток, по обоим исследованным показателям у больных основной группы имелось значимое снижение в отношении контрольной (на 42,9 и 24,0 %, $p < 0,01$, $p < 0,05$ соответственно).

Отмечена незначимая тенденция к превышению абсолютного числа CD3+CD25+ у больных группы СЛТ+СИТ по отношению к СЛТ. Имелись значимые различия с контролем как по абсолютному, так и по относительному показателям ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

Таким образом, лечение злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы является одним из ключевых моментов в онкологической помощи ввиду широкой распространенности данных заболеваний и значительной доли неблагоприятных исходов в структуре опухолевой патологии [7]. Следует заметить, что в последние годы отмечается значительный рост частоты гормонально зависимых заболеваний органов женской репродуктивной системы [8], что еще более подчеркивает актуальность данной патологии в онкологической клинике. В последнее время наибольшая динамика способов лечения онкологических больных связана с прогрессом иммунотерапии [9, 10].

Имеющиеся литературные данные [11] свидетельствуют о наличии нерешенных задач при проведении иммунотерапии у больных злокачественными новообразованиями. Одним из важных моментов является то, что использование других подходов к противоопухолевому лечению оказывает негативное влияние на состояние иммунной системы. Последнее не дает в полной мере реализоваться потенциальным возможностям методов СИТ.

Методики иммунотерапии, основанные на стимуляции лимфоцитов опухолевым антигеном, индукторами пролиферации и дифференцировки или сочетанием данных воздействий достаточно известны и хорошо себя зарекомендовали при различных злокачественных новообразованиях [12]. Однако в подавляющем большинстве исследований их применение представляло собой этап в лечении опухолевых заболеваний, обычно следующий за оперативным и/или специфическим лечением.

Мы полагаем, что данный подход к применению иммунотерапии может уступать в эффективности одновременному использованию комплекса методов лечения, поскольку при наличии перерыва в терапии может восстановиться ряд механизмов иммунной толерантности опухоли и произойти ее диссеминация.

Результаты проведенного исследования показателей клеточного звена иммунной системы у больных раком шейки матки IIВ и III клинической стадии показали наличие определенного их

повышения при одновременном проведении иммунотерапии и СЛТ в отношении группы СЛТ. В то же время сохранялось статистически значимое снижение по большинству важных параметров (в т. ч. по содержанию лимфоцитов, обладающих киллерной активностью), что свидетельствует о необходимости дополнительного стимулирования иммунной системы для улучшения результатов специфической иммунотерапии.

Литература

1. *Kapp M., Rasche L., Einsele H., Grigoleit G.U.* Cellular therapy to control tumor progression // *Curr Opin Hematol.* 2009. Vol. 16 (6). P. 437–443.
2. *Su J.H., Wu A., Scotney E. et al.* Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential // *BioDrugs.* 2010. Vol. 24 (2). P. 109–129.
3. *de Rezende L.C., Silva I.V., Rangel L.B., Guimaraes M.C.* Regulatory T cell as a target for cancer therapy // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010. Vol. 58 (3). P. 179–90.
4. *Tan P.H., Lota A.S.* Interaction of current cancer treatments and the immune system: implications for breast cancer therapeutics // *Expert Opin Pharmacother.* 2008. Vol. 9 (15). P. 2639–2660.
5. *Gilbert S.C.* T-cell-inducing vaccines – what's the future // *Immunology.* 2012. Vol. 135 (1). P. 19–26.
6. *Chaudhuri D., Suriano R., Mittelman A., Tiwari R.K.* Targeting the immune system in cancer // *Curr Pharm Biotechnol.* 2009. Vol. 10 (2). P. 166–184.
7. *Трапезников Н.Н.* Заболеваемость злокачественными новообразованиями и смертность от них населения стран СНГ / Н.Н. Трапезников, Е.М. Аксель. М., 2000.
8. *Танатова З.А.* Особенности и повышение эффективности лечения злокачественных новообразований репродуктивной системы женщин в регионе Семипалатинского ядерного полигона: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / З.А. Танатова. Астана, 2007. 44 с.
9. *van den Broek M., von Boehmer L., Knuth A.* Developments in cancer immunotherapy // *Dig Dis.* 2010. Vol. 28 (1). P. 51–56.
10. *Yoshida Y., Nakajima J., Wada H., Kakimi K.* $\gamma\delta$ T-cell immunotherapy for lung cancer // *Surg Today.* 2011. Vol. 41 (5). P. 606–611.
11. *Lesterhuis W.J., Haanen J.B., Punt C.J.* Cancer immunotherapy – revisited // *Nat Rev Drug Discov.* 2011. Vol. 10 (8). P. 591–600.
12. *White R. L.Jr; Amin A.* Cancer immunotherapy // *Surg Oncol Clin N Am.* 2011. Vol. 20 (3). P. 531–554.