

УДК 618.146-006.6-097:615.37

Д.К. Кенбаева¹, А.Ф. Лазарев²**ЧИСЛЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ В ХОДЕ ИММУНОТЕРАПИИ**¹Городской онкологический диспансер, Астана²Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул**Контактная информация:**

Кенбаева Динара Кумаровна, канд. мед. наук, заведующая отделением гинекологии

Адрес: Республика Казахстан, г. Астана, пр-т Шакарима Кудайбердиева, д.24/1, кв. 116; тел. 8(701)543-0599

e-mail: dikenb@mail.ru

Статья поступила: 31.08.2012, принята в печать: 15.11.2012.

Резюме

Цель исследования – оценка иммунологической эффективности способа специфической иммунотерапии больных раком шейки матки в сочетании с лучевой терапией. Обследована 81 больная раком шейки матки IIВ и III клинической стадий, подвергавшихся сочетанной лучевой терапии. В группе из 40 человек дополнительно проведена иммунотерапия, заключающаяся в реинфузии индуцированных опухолевым антигеном и препаратом ИЛ-2 лимфоцитов.

При проведении иммунотерапии была выявлена динамика к нормализации исследованных показателей иммунной системы. Однако сохранялись статистически значимые различия с контрольной группой по ряду ключевых исследованных параметров. Специфическая клеточная иммунотерапия, на наш взгляд, не обеспечивает адекватного роста численных показателей противоопухолевого клеточного иммунитета, что может быть одной из причин неблагоприятных отдаленных исходов лечения.

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

D.K. Kenbaeva, A.F. Lazarev

**NUMERICAL INDICATORS OF CELLULAR IMMUNITY DURING AN IMMUNOTHERAPY
OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER**¹City Oncology Center, Astana²Altay Regional Oncology Center, Barnaul**Resume**

Research objective: An assessment of immunological efficiency of a method of specific immunotherapy in patients with cervical cancer in a combination to radiation therapy.

It is surveyed 81 patients with cervical cancer of IIВ and the III clinical stages which were exposed to combined radiotherapy. In group of 40 people in addition the immunotherapy is carried out consisting in a reinfuziya of lymphocytes induced by tumoral anti-gene and a preparation interleukin-2.

At carrying out an immunotherapy dynamics to normalization of the investigated indicators of immune system was revealed. Significant distinctions with control group on a number of the main parameters however remained. The specific cellular immunotherapy, in our opinion, doesn't provide adequate growth of numerical indicators of antineoplastic cellular immunity that can be corrected by application of methods of an adoptive immunotherapy.

Key words: cervical cancer; cell immunity; specific cell immune therapy.**Введение**

Иммунотерапию злокачественных новообразований трудно назвать новым методом в онкологии, поскольку история ее развития насчитывает уже более 50 лет [11]. В современных условиях более 15 % исследований в области лечения злокачественных новообразований базируются на подходах, связанных с иммунотерапией, и до 30 % прикладных исследований в области иммунотерапии ассоциированы с лечением новообразований [2; 4; 5].

Важнейшими достижениями в области иммунотерапии злокачественных новообразований являются развитие способов лечения широко распространенных новообразований – меланомы, рака почек, рака легких [6; 10]. В то же время остается широкий спектр злокачественных опухолей, иммунотерапия которых в достаточной степени не разработана. Хотя ключевой причиной является малая иммуногенность многих новообразований [6], кро-

ме этого применению методов иммунотерапии может препятствовать снижение морфофункциональных показателей защитных систем организма, связанное с наличием опухолевого процесса и применением способов специфической иммунотерапии [10]. Преодоление обоих этих ограничений – кардинальное направление развития иммунотерапии злокачественных опухолей [3].

РШМ является одним из распространенных онкологических заболеваний у женщин [9]. Результаты его лечения до настоящего времени оставляют желать лучшего. Достаточно высока частота запущенных форм данной патологии, основным методом лечения которых является сочетанная лучевая терапия. Подходы к иммунотерапии РШМ в достаточной мере не разработаны, что послужило основанием инициации настоящего исследования.

Цель исследования – оценка иммунологической эффективности специфической иммунотерапии в сочетании с лучевой терапией больных раком шейки матки.

Материалы и методы

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

Комплексное лечение больных состояло из применения СЛТ и сочетанной лучевой терапии в комбинации со специфической иммунотерапией (СЛТ + СИТ). Специфическая иммунотерапия проводилась по разработанной методике, основанной на реинфузии аутогенных лимфоцитов, инкубированных с гомогенатом опухолевой ткани и ИЛ-2.

СЛТ проводилась 21 больной РШМ ПВ стадии и у 20 больных РШМ III стадии. СЛТ + СИТ проводилась 20 больным РШМ ПВ стадии и 20 больным РШМ III стадии.

Контрольную группу составили 45 практически здоровых женщин, репрезентативных по группам больных по возрасту.

Показатели клеточного иммунитета определялись в динамике комплексного лечения. Осуществлено иммунотипирование следующих форм иммуноцитов: $CD3^+$ – зрелые Т-лимфоциты (диагностикум Beckman Coulter, №А07746); $CD3^+CD4^+$ – Т-хелперы (№А07750); $CD3^+CD8^+$ – Т-супрессоры и киллеры (№А07757); $CD3-CD56^+CD16^+$ – натуральные киллеры (№А07735); $CD3^+CD56^+CD16^+$ – Т-киллеры (№А07415); $CD19^+$ – В-лимфоциты (№6603859); $CD4^+CD25^+$ – «юные» $CD4^+$ клетки (№М3486U); $CD95^+$ – преапоптотические лейкоциты всех кластеров дифференцировки (№М1504).

Статистическая обработка. При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Параметрические методы включали сравнение количественных признаков 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 [1]. 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 $p < 0,05$. Статистический анализ осуществлялся с использованием прикладного пакета SPSS Statistics 17.0.1.

Результаты и обсуждение

Результаты применения специфической иммунотерапии после лучевой терапии у больных РШМ ПВ ст. представлены в табл. 1.

При проведении СИТ была зарегистрирована тенденция к повышению числа лейкоцитов, которая, однако, не характеризовалась достоверными различиями с показателем после проведения СЛТ. Напротив, сохранялось достоверное снижение данного показателя относительно контрольной группы (на 34,7 %, $p < 0,01$).

Тенденция к повышению была выявлена и при анализе содержания лимфоцитов, причём средний показатель в группе СИТ не имел достоверных

различий с контрольной группой, в отличие от СЛТ. Несмотря на наличие умеренной тенденции к повышению числа Т-лимфоцитов в периферической крови, их абсолютное и относительное содержание оставалось ниже показателя контрольной группы (на 21,4 и 14,5 % соответственно, $p < 0,05$ в обоих случаях).

В группе больных, подвергавшихся СЛТ, степень снижения абсолютного содержания $CD3^+CD4^+$ клеток была недостоверной, как и тенденция к повышению при проведении СИТ. Существенных различий по относительному содержанию клеток данного класса в сравниваемых группах не было.

У больных вышеуказанной категории в обеих группах, выделенных в зависимости от проводимой терапии, не было также выявлено существенных особенностей содержания $CD3^+CD8^+$ клеток. При проведении СИТ отмечалось только недостоверное снижение абсолютного и относительного показателей.

Анализ содержания в крови $CD3^+CD56^+CD16^+$ клеток при проведении СЛТ показал наличие достоверного снижения как по абсолютному, так и по относительному показателю.

В то же время при проведении СИТ оба параметра не имели достоверных различий с таковыми в группе контроля, а абсолютное содержание достоверно превышало тот же показатель группы СЛТ (на 36,4 %, $p < 0,05$).

В процессе иммунотерапии была зарегистрирована тенденция к повышению абсолютного и относительного содержания Т-киллеров. Однако, она была недостоверной, и различия с контролем оставались весьма значительными (на 36,7 и 30,2 % соответственно, $p < 0,05$ в обоих случаях).

Наблюдалась также тенденция к увеличению численных показателей уровня В-лимфоцитов, при этом имевшиеся в группе СЛТ достоверные различия с контролем при проведении СИТ отсутствовали. Различия между группами СЛТ и СЛТ+СИТ по показателям содержания $CD4^+CD25^+$ клеток были недостоверны, и во второй группе сохранялись достоверно более низкие их величины в сравнении со средними показателями группы контроля.

Также не было зарегистрировано существенных различий по абсолютному содержанию $CD95^+$ лимфоцитов, относительная величина данного показателя имела тенденцию к снижению.

Динамика роста соотношения $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ привела к его превышению в группе СИТ над контролем, хотя различия во всех случаях были статистически незначимыми.

При сравнении величины индекса активации в группах СЛТ и СЛТ+СИТ заметно, что во втором случае уровень был выше, а различия с контрольной группой – меньшими, чем в первом. Тем не менее, различия между группами больных оставались недостоверными.

У больных РШМ III ст. иммунологическое исследование позволило получить данные, представленные в табл. 2.

Содержание лейкоцитов в крови у больных группы СИТ оставалось сниженным по отношению к контролю, различия были достоверными (на 39,0 %, $p < 0,01$).

В динамике не было зарегистрировано практически никаких изменений в отношении концентрации лимфоцитов, абсолютное содержание иммунокомпетентных клеток данного класса в группе СИТ было сниженным относительно контроля на 25,2 % ($p < 0,05$).

Таблица 1

Динамика показателей клеточного звена иммунитета в зависимости от проводимого лечения у больных РШМ ПВ стадии

Показатель	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ ПВ ст.		P1	P2	P3
		СЛТ, n=21	СЛТ ⁺ СИТ, n=20			
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	6,51 \pm 0,31	3,93 \pm 0,23	4,25 \pm 0,23	<0,01	<0,01	>0,05
Лимфоциты, $\times 10^9$ /л	2,10 \pm 0,09	1,70 \pm 0,09	1,93 \pm 0,09	<0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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
CD19 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,24 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02	<0,05	>0,05	>0,05
CD19 ⁺ , %	11,4 \pm 0,6	8,8 \pm 0,6	9,8 \pm 0,6	<0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,21 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	10,0 \pm 0,6	8,2 \pm 0,6	8,3 \pm 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD95 ⁺ , $\times 10^9$ /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
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,28 \pm 0,13	2,17 \pm 0,15	2,45 \pm 0,17	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ /CD95 ⁺	0,24 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	<0,01	<0,05	>0,05

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.

Таблица 2

Динамика показателей клеточного звена иммунитета в зависимости от проводимого лечения у больных РШМ III стадии

Показатель	Контрольная группа, n=45	Больные РШМ III ст.		P1	P2	P3
		СЛТ, n=20	СЛТ ⁺ СИТ, n=20			
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	6,51 \pm 0,31	3,68 \pm 0,26	3,97 \pm 0,25	<0,01	<0,01	>0,05
Лимфоциты, $\times 10^9$ /л	2,10 \pm 0,09	1,53 \pm 0,10	1,57 \pm 0,09	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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 ⁺ , $\times 10^9$ /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
CD19 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,24 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	<0,01	<0,05	>0,05
CD19 ⁺ , %	11,4 \pm 0,6	8,5 \pm 0,7	8,9 \pm 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,21 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	<0,01	<0,01	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	10,0 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	7,6 \pm 0,6	<0,05	<0,05	>0,05
CD95 ⁺ , $\times 10^9$ /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
CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,28 \pm 0,13	2,16 \pm 0,16	2,43 \pm 0,18	>0,05	>0,05	>0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ /CD95 ⁺	0,24 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	<0,01	<0,01	>0,05

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.

Аналогичные показатели были характерны для абсолютного и относительного содержания CD3⁺ клеток. По первому из них сохранялись статистически значимое снижение по отношению к контролю, по второму – различий зарегистрировано не было.

В динамике была выявлена только умеренная тенденция к повышению содержания CD3⁺CD4⁺ клеток в группе проведения СИТ. Различия с контролем по данному показателю оставались (снижение на 18,0 %; p<0,05). По относительному содержанию клеток данного класса в обеих подгруппах больных имелось статистически незначимое превышение над показателем контроля.

Отмечалось только умеренное и статистически незначимое повышение содержания в крови натуральных киллеров (CD3⁺CD56⁺CD16⁺). По абсолютному показателю превышение над группой СЛТ составило 20,9 %, по относительному – 24,3. В обоих случаях показатели были ниже, чем у здоровых лиц (p<0,01, p<0,05).

Имелось превышение содержания Т-киллеров в группе СЛТ⁺СИТ над больными, у которых проводилась только СЛТ. Тем не менее, различия с контролем оставались статистически значимыми (на 45,5 %, p<0,05). По относительной величине данного показателя, напротив, был выявлен рост на

56,0 % ($p < 0,01$). Тем не менее, различия с группой контроля составили 26,4 % ($p < 0,05$).

Не было существенных особенностей в зависимости от проводимой терапии по содержанию $CD19^+$ в крови. Различия по абсолютному значению данного показателя с контролем составили 41,7 %, по относительному – 21,9 ($p < 0,05$ в обоих случаях). Также не отмечалось существенной динамики в отношении уровня активированных Т-хелперов, по обоим исследованным показателям сохранялось статистически значимое снижение в отношении контрольной группы (на 42,9 и 24,0 %; $p < 0,01$; $p < 0,05$ соответственно).

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

Имелось недостоверное повышение иммунорегуляторного индекса в группе больных, получавших СИТ, по отношению как к контролю, так и к группе СЛТ.

Тенденция к превышению уровня индекса активации никак не повлияла на степень значимости различий по данному показателю с контролем при проведении СИТ. Они составили 54,2 % ($p < 0,01$).

Заключение

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии некоторых различий численных показате-

телей системы иммунитета у больных раком шейки матки в группах проведения СЛТ и иммунотерапии после лучевой терапии. Так, применение иммунотерапии позволило добиться определенного увеличения абсолютного и относительного содержания натуральных киллеров и НКТ-клеток.

В то же время, мы полагаем, что сохраняющиеся различия с контрольной группой по содержанию ключевых факторов клеточного противоопухолевого иммунитета в сторону снижения свидетельствуют о сохраняющемся и на фоне СИТ вторичном иммунодефиците.

При интерпретации его клинического значения следует учитывать сохраняющийся после СЛТ большой объем ткани опухоли, в том числе клеток, способных к делению, за счет которых развиваются рецидивы и отдаленные метастазы в период после осуществления терапии.

Функциональные возможности клеточных механизмов иммунной системы, подвергавшихся, вдобавок, негативному воздействию в ходе лучевой терапии, могут оказаться недостаточными для элиминации или подавления активности сохранившихся клеток новообразования.

Поэтому мы полагаем, что изолированное использование методики СИТ при отсутствии устранения основного объема новообразования путем оперативного вмешательства является мерой, снижающей риск рецидива или развития метастазов, однако, недостаточной и могущей быть потенцированной применением средств и методов неспецифической активации клеточного иммунитета.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Aguilar L.K., Guzik B.W., Aguilar-Cordova E. Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: mechanisms and clinical development // *J Cell Biochem.* – 2011. – 112(8). – P. 1969–77.
3. Berzofsky J.A., Terabe M., Wood L.V. Strategies to use immune modulators in therapeutic vaccines against cancer // *Semin Oncol.* – 2012. – 39(3). – P. 348–57.
4. van den Broek M., von Boehmer L., Knuth A. Developments in cancer immunotherapy // *Dig Dis.* – 2010. – 28(1). – P. 51–6.
5. Inamoto T., Azuma H. Immunotherapy of genitourinary malignancies // *J Oncol.* – 2012. – 2012. – ID 397267.
6. Gajewski T.F. Cancer immunotherapy // *Mol Oncol.* – 2012. – 6(2). – P. 242–50.
7. George S., Pili R., Carducci M.A., Kim J.J. Role of immunotherapy for renal cell cancer in 2011 // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2011. – 1;9(9). – P. 1011–8.
8. Hersey P. Immunotherapy of melanoma // *Asia Pac J Clin Oncol.* – 2010. – 6 Suppl 1. – S 2–8.
9. Krieger N., Bassett M.T., Gomez S.L. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010 // *Lancet.* – 2012. – 14;379(9824). – P. 1391–2.
10. Pandolfi F., Cianci R., Pagliari D. et al. The immune response to tumors as a tool toward immunotherapy // *Clin Dev Immunol.* – 2011. – 2011. – ID 894704.
11. Stan R., Wolchok J.D., Cohen A.D. DNA vaccines against cancer // *Hematol Oncol Clin North Am.* – 2006. – 20(3). – P. 613–36.

Список сокращений

РШМ	– рак шейки матки
СЛТ	– сочетанная лучевая терапия