

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОБОСНОВАНИИ СОЧЕТАННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ПОВЕРХНОСТНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.

А.Г. Саранкин

Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова.
Рязанская городская клиническая больница №11.

В работе рассматриваются иммунологические аспекты поверхностного рака мочевого пузыря, взаимосвязь местных и системных иммунных процессов. Оценена роль папилломавирусов человека в онкологическом процессе. Произведено обоснование назначения системной интерфероновой терапии при поверхностном раке мочевого пузыря.

Рак мочевого пузыря (РМП), по данным ВОЗ, составляет до 3% от всех злокачественных новообразований у человека. В Рязанской области на долю РМП среди всех злокачественных новообразований у мужчин приходится 4,9% [4].

РМП принято подразделять на поверхностный и мышечноинвазивный. Результаты лечения поверхностного РМП (ПРМП) в настоящее время расцениваются как неудовлетворительные [5].

Одной из особенностей ПРМП является склонность к рецидивированию. По данным литературы, процент рецидивов после хирургического удаления первичного очага составляет 65-88% [12]. Такой высокий процент рецидивирования ПРМП, а также мультифокальность поражения связываются с системными, молекулярно-генетическими нарушениями в уротелии (дефект хромосомы 9 и повышенная экскреция VEGF (Васкулярный эндотелиальный фактор роста), изменения в 17 хромосоме с мутацией гена p53 и гена ретинобластомы Rb).

Известны различные варианты течения ПРМП. Так, например, опухоли, ограниченные слизистой, и имеющие папиллярную структуру могут достаточно долго протекать доброкачественно, без прогрессии при этом часто рецидивируя. Вместе с тем, так называемые, плоские поражения, включая cancer in situ, ведут себя крайне агрессивно. Обнаруживается связь между генетическими изменениями и гистологическими вариантами РМП. При папиллярных неинвазивных формах обнаруживается дефект 9 хромосомы, а изменения в 17 хромосоме (p53) выявлены только в *высокозлокачественных* опухолях, которые в последствии становятся мышечноинвазивными. Доказано развитие инвазивных форм непосредственно из рака in situ. [6]

Существование, по сути, двух отличающихся в своем развитии форм ПРМП, по-видимому, можно связать с действием различных иницирующих, этиологических факторов. Известна роль табакокурения как одного из факторов риска развития и прогрессии РМП. Причем, установлено воздействие курения на мутацию гена p53, которая, в свою очередь, приводит к развитию *высокозлокачественных* форм РМП [16]. В литературе имеются указания на роль папилломавируса человека (HPV) в развитии папиллярных, *низкозлокачественных* новообразований мочевого пузыря [8,10,11]. Рак, опосредованный HPV, чаще возникает у больных с дефицитом клеточного звена иммунитета, например, после трансплантации почки или у ВИЧ-инфицированных [14].

В современных схемах лечения ПРМП особое место принадлежит внутривезикулярной иммунотерапии. Препаратом выбора считается вакцина БЦЖ. Со времени внедрения в клиническую практику А.Могалес в 1976 году вакцина БЦЖ доказала свою эффективность и входит в стандарты лечения ПРМП [1]. Имеются работы, свидетельствующие о высокой эффективности интравагинальной цитокиновой терапии [13,2].

Эффективность внутривезикулярной иммунотерапии, оцениваемая по частоте рецидивов, по разным данным, составляет от 12 до 63%. Анализируя сводные данные о 6 рандомизированных исследованиях E.Shenkman и D.L.Lamm [15] сообщают, что в среднем, частота рецидивов после внутривезикулярной иммунотерапии БЦЖ снижается до 25%.

Известно, что лучший эффект от БЦЖ наблюдается у тех больных, у которых отмечены более высокие показатели Т-клеточного иммунитета и большее общее количество лимфоцитов в

периферической крови [7]. В литературе имеются указания на то, что присутствие папилломавирусной инфекции предусматривает назначение как местного лечения, так и системной иммунотерапии [3]. Комбинация интракавитарной BCG и интерферона $\alpha 2b$ терапии при ПРМП в исследованиях ряда авторов показала свою безопасность и эффективность [9]. Вместе с тем в доступной нам литературе не обнаружено данных о системном назначении интерферона $\alpha 2b$ в лечении и профилактике рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря.

Материалы и методы

Иммунологическому обследованию были подвергнуты 86 больных ПРМП в возрасте от 21 до 78 лет (в среднем 54,5 года). Из них 48 (55,8%) больных имели первичный рак, у 38 (44,2%) пациентов отмечалось рецидивное течение заболевания. Мужчин было 62 (72%), женщин – 34 (28%). У всех больных был верифицирован переходноклеточный рак разной степени дифференцировки; G₁-у 43(50%), G₂- у 34 (39,5%), G₃- у 9 (10,5%). По степени распространенности T_a- у 27 больных, T₁- у 59 больных.

Обследование включало определение качественного и количественного состава популяций Т,В-лимфоцитов периферической крови. Иммунофенотипирование лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) проводили методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител НПЦ «Сорбент». Забор крови осуществлялся на стадии первичного выявления опухоли, при обнаружении рецидива заболевания, при наблюдении в безрецидивный период (через 1мес, 3мес, и через 1 год). Отдельно проведена сравнительная оценка состояния клеточного иммунитета периферической крови у больных в стадии длительной (более 1 года) ремиссии (n=43) и при обнаружении рецидива (n=67). Контрольную группу составили 25 пациентов, не имевших хронических, онкологических заболеваний (молодой контингент, призывники и т.д.). Оценен также местный иммунный процесс в гистологическом материале - выраженность стромальной клеточной инфильтрации по степеням - низкая, умеренная и высокая. Проведена качественная оценка иммунокомпетентных клеток в строме опухоли и выделены преобладающие клеточные элементы - плазмоциты, лимфоциты, макрофаги, а также, нейтрофилы.

С 2002г. в клинике методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обследовано 48 больных на предмет папилломавирусной инфекции. Материал, взятый непосредственно из опухоли исследовался на присутствие ДНК высокоонкогенных типов HPV 16и 18. Больные, у которых выявлялся HPV, выделены в самостоятельную группу и были подвергнуты иммунологическому обследованию по указанной выше методике.

35 больным, у которых определялись стадии T_aG₃, T₁G₂₋₃, выявлялись множественные или рецидивные опухоли а также опухоли >3см, т.е. имеющие умеренный и высокий риск рецидива и прогрессии в качестве противорецидивного лечения проводилась сочетанная - местная и системная иммунотерапия. Больные были подвергнуты стандартной трансуретральной резекции или открытой операции. Протокол противорецидивного лечения включал назначение интракавитарно БЦЖ «Иммурон»(100 мг еженедельно в течении 6 недель) в сочетании с системной иммунотерапией рекомбинантным интерфероном $\alpha 2b$ «Виферон» (в течение 3-4 недель перед инстилляциями БЦЖ, ежедневно по 1 000 000 МЕ). Из 35 пролеченных по указанной методике больных было 25 HPV-позитивных пациентов и 10 HPV-отрицательных. Субпопуляции Т и В- лимфоцитов периферической крови определяли у всех 35 больных до и после окончания 3х недельного курса системной иммунотерапии. Период наблюдения после лечения составил от 8 до 26 месяцев (в среднем 17 месяцев).

Результаты и обсуждение

Иммунологические показатели у больных с ПРМП в стадии длительной ремиссии и при клинически определяемой опухоли представлены в таблице 1. Было выявлено снижение уровней CD3, CD4 и CD16 лимфоцитов у больных с определяемой клинически опухолью по сравнению с контрольной группой. Однако, по большей части, выявленные различия были незначительными (p>0,05). Установлено достоверное снижение иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) и абсолютных показателей CD16-лимфоцитов в этой группе. У больных ПРМП, которые наблюдались без рецидива от 1 года и более, показатели клеточного иммунитета незначительно отличались от показателей контрольной группы.

Таблица 1

Иммунологические показатели у больных поверхностным раком мочевого пузыря в стадии длительной (более 1 года) ремиссии и при клинически определяемой (первичной или рецидивной) опухоли (M±m)

Показатели	Ремиссия n=43	Клинически определяемый t-г n=67	Контрольная группа n=25
Лимфоциты(%) (10 ⁹ /л)	34,2± 1,8 1,6±0,2	32,1 ± 1,3 1,5±0,3	36,0±0,2 2,5±0,1
CD3 (%) (10 ⁹ /л)	61,6± 3,1 1,1±0,08	59,2 ± 1,3 0,9±0,1	62,6±0,3 1,2±0,1
CD4 (%) (10 ⁹ /л)	42,6 ± 1,9 0,51±0,05	34,4 ± 2,1 0,35±0,1	38,9±2,0 0,39±0,1
CD8 (%) (10 ⁹ /л)	21,0 ± 1,4 0,25±0,06	23,1 ± 1,5 0,29±0,01	20,6±1,1 0,22±0,03
CD4/CD8	2,0 ± 0,07	1,48± 0,04*	1,88±0,06
CD19 (%) (10 ⁹ /л)	22,9 ± 1,7 0,26±0,07	23,4 ± 1,1 0,34±0,04	21,9±1,2 0,32±0,02
CD16 (%) (10 ⁹ /л)	18,4 ± 2,0 0,15±0,07	14,8 ± 2,0 0,09±0,06*	17,7±1,6 0,16±0,05

Примечание: *- достоверное различие с показателями в контрольной группе.(p<0,05)

Обращает внимание возрастание значений CD3, CD4, CD16, CD4/CD8 у больных в стадии ремиссии. Оценивая полученные данные можно говорить о восстановлении показателей иммунограмм в период ремиссии у больных поверхностным раком мочевого пузыря.

Выявленные иммунные нарушения у больных манифестными формами рака явились одним из оснований для назначения больным системной иммунотерапии. У больных, получавших ИНФ-а, отмечено повышение процентного содержания CD4, CD16 и иммунорегуляторного индекса; достоверным было увеличение CD16 в абсолютных цифрах (Таб. 2)

Таблица 2

Иммунологические показатели у больных ПРМП до и после проведения 3х недельного курса системной иммунотерапии (M±m) n= 34

Показатели	До лечения	После системной иммунотерапии
лимфоциты,(%) (10 ⁹ /л)	32,1 ± 1,2 1,5±0,2	34,6 ± 1,9 1,9±0,1
CD3(%) (10 ⁹ /л)	59,2 ± 1,3 0,9±0,1	60,5 ± 1,3 1,0±0,1
CD4 (%) (10 ⁹ /л)	34,4± 2,1 0,35 ±0,1	40,8 ± 2,1 0,51±0,1
CD8 (%) (10 ⁹ /л)	23,1 ± 1,5 0,25±0,01	25,9 ± 1,2 0,6±0,1
CD4/CD8	1,48 ± 0,04	1,58 ± 0,4
CD19 (%) (10 ⁹ /л)	23,4 ± 1,1 0,34±0,01	22,9 ± 1,8 0,2±0,1
CD16 (%) (10 ⁹ /л)	14,8 ± 2,1 0,09±0,01	16,7 ± 1,7 0,22±0,1*

Примечание: *- достоверное различие с показателями до лечения (p<0,05)

Исследованы клеточные параметры иммунной системы периферической крови у больных ПРМП, у которых обнаружено присутствие папилломавируса, и отдельно - у которых данный инфекцион-

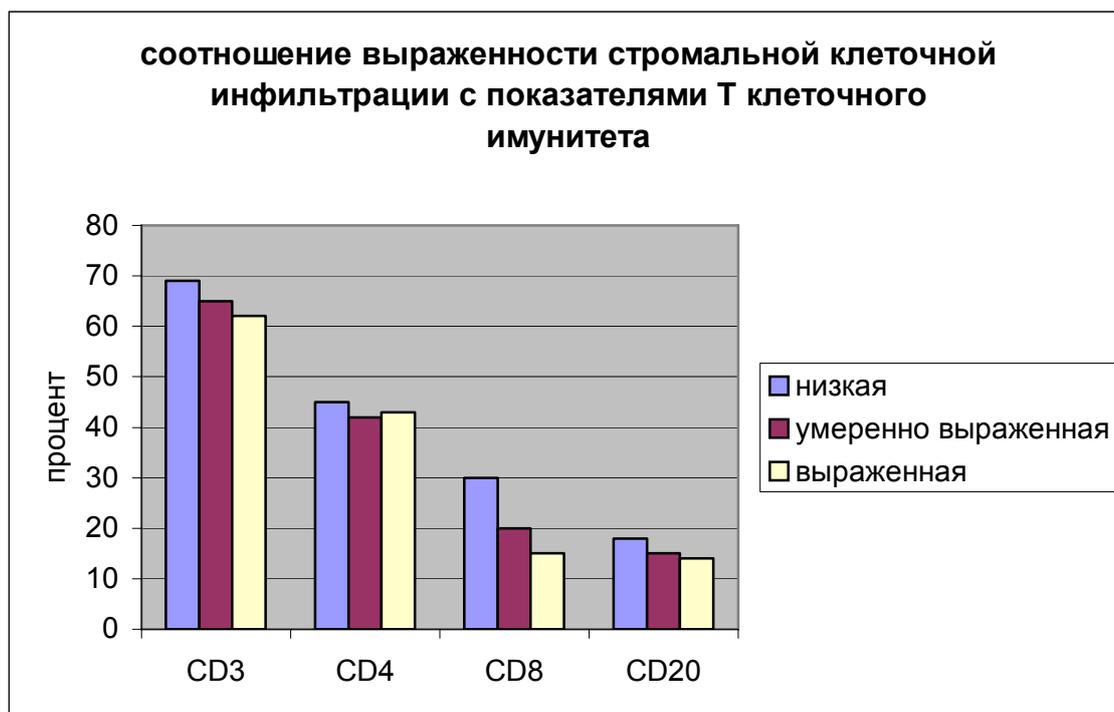
ный агент не был выявлен. Из 44 обследованных пациентов с ПРМП у 29 выявлено ДНК HPV 16, 18. Иммунологическое исследование проводилось на момент обнаружения опухоли. Контрольная группа – здоровые пациенты. Анализируя полученные данные, которые представлены в *таблице 3*, было выявлено повышение процентного содержания и общего количества CD8 лимфоцитов у HPV+ пациентов по сравнению с контрольной группой, и связанное с этим показателем снижение иммунорегуляторного индекса. Остальные различия в сравниваемых группах были не столь существенными. Принимая во внимание снижение регуляторного индекса, некоторое уменьшение НК-активности у больных, инфицированных HPV, по сравнению с неинфицированными больными, можно предположить наличие иммуносупрессии у инфицированных пациентов ПРМП

Таблица 3 Иммунологические показатели у HPV+ и HPV- пациентов с ПРМП (M±m)

Показатели	HPV+ пациенты n=29	HPV- пациенты n=38	Контрольная группа n=25
Лимфоциты(%) (10 ⁹ /л)	35,2± 1,4 1,7±0,2	32,7 ± 1,1 1,6±0,3	36,0±0,2 2,5±0,1
CD3 (%) (10 ⁹ /л)	64,9± 3,0 1,6±0,08	58,8 ± 1,1 0,9±0,4	62,6±0,3 1,2±0,1
CD4 (%) (10 ⁹ /л)	36,6 ± 1,6 0,40±0,05	35,5 ± 2,0 0,33±0,1	38,9±2,0 0,39±0,1
CD8 (%) (10 ⁹ /л)	25,0 ± 1,9 0,45±0,08*	22,1 ± 1,4 0,25±0,01	20,6±1,1 0,22±0,03
CD4/CD8	1,46 ± 0,05	1,60± 0,08	1,88±0,06
CD19 (%) (10 ⁹ /л)	20,9 ± 1,6 0,27±0,08	22,5 ± 1,2 0,35±0,06	21,9±1,2 0,32±0,02
CD16 (%) (10 ⁹ /л)	13,1 ± 1,0 0,11±0,06	14,9 ± 1,9 0,14±0,05	17,7±1,6 0,16±0,05

Примечание: *- достоверное различие с показателями в контрольной группе.(p<0,05)

В задачи нашей работы входило также исследование корреляции местных и системных иммунологических проявлений у больных ПРМП. Установлено, что в исследованном гистологическом материале при высокой степени клеточной инфильтрации в строме опухоли, выявлялось снижение показателей Т – клеточного иммунитета в периферической крови. Как видно на диаграмме, у больных ПРМП, у которых отмечена высокая насыщенность стромы опухоли *иммунокомпетентными* клетками наиболее значимо уменьшались показатели CD8 в иммунограммах (различия показателей CD8 в группах выраженной и скудной клеточной инфильтрации стромы достоверны, p<0,05). Высокая инфильтрация стромы лимфоцитами, макрофагами, плазмócитами у больных ПРМП по-видимому отражает функциональную недостаточность иммунных клеток, что в клинике подтверждалось более агрессивным течением бластоматозного процесса у данной категории пациентов. При этом, из 27 больных, у которых выявлена интенсивная инфильтрация стромы *нейтрофилами* при умеренной или слабо выраженной лимфоидной реакции, клинически в течение 1 года у 24 выявлен рецидив. Интересен тот факт, что в этой группе больных из 27 человек, у 12 был сахарный диабет.



Папилломавирус выявлен при G₁-у 22 больных, при G₂ у 7, при G₃ ни у одного. Для нас представляло интерес изучение морфологических проявлений папилломавирусной инфекции. У HPV+ пациентов, как правило, имелась достаточно выраженная лимфоидная стромальная инфильтрация, при этом не было выявлено преобладания каких-либо клеточных элементов в строме. Опираясь на полученные ранее данные, можно трактовать найденные у инфицированных пациентов изменения как предрасположенность к неблагоприятному течению.

У больных, получавших лечение, включающее интерферон и БЦЖ, в группе HPV+(25 человек) рецидивы в течение первого года отмечены у 3(12%) пациентов; в сроки наблюдения до 26 мес. - 7(28%) больных. Прогрессии по Т не отмечено, прогрессия по G-у 2 больных (8%). В группе из 10 HPV- больных, получавших лечение, рецидивы в течение года зафиксированы у 2 больных (20%), в сроки наблюдения до 28 месяцев- у 4 (40%) больных. Прогрессия по Т- 1 больной, по G- 2 больных.

Побочные эффекты выражались в местных и общих реакциях, таких как, лихорадка, гриппоподобное состояние, дизурия. Частота побочных эффектов была следующей: лихорадка и гриппоподобное состояние- 19%, дизурия и цистит- 45%. Каких-либо серьезных *осложнений* отмечено не было.

Выводы

1. Состояние иммунитета у пациентов с клинически определяемым поверхностным раком мочевого пузыря носит характер вторичного Т- клеточного иммунодефицита..
2. Критериями для назначения системной иммунотерапии при поверхностном раке мочевого пузыря являются: снижение показателей клеточного иммунитета, обнаружение ДНК папилломавирусов в опухоли.
3. Сочетание внутривезикулярной иммунотерапии БЦЖ с системной иммунотерапией интерфероном позволяет снизить частоту рецидивов папиллярных форм ПРМП, при этом выявлено восстановление нормальных показателей клеточного иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаптированные рекомендации Европейской Ассоциации Урологов по диагностике и лечению рака простаты и рака мочевого пузыря./Под ред. Переверзева А.С. Харьков 2002.- 80с.

2. Алексеев Б.Я. Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного рака мочевого пузыря. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Москва, 1998г.
3. Аполихина И.А. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин /Под ред. Кулакова В.И.-М.-ГЭОТАР-МЕД.-2002.-112с.
4. Журавлева О.П., Зубарева Т.П., Судаков И.Б., Шомова Н.И. Анализ некоторых показателей онкологической заболеваемости в Рязанской области//Диагностика и лечение больных онкологического профиля. Сборник научных трудов. Рязань 2004- с.64-68.
5. Мартов А.Г., Сысоев П.А. Лечение поверхностного рака мочевого пузыря// Урология.- 2000.-№2.- с.44-49.
6. Переверзев А.С., Петров С.Б. Опухоли мочевого пузыря.-Харьков, 2002.- 303с.
7. Цигану В.И. Изменения иммунного статуса у больных раком мочевого пузыря в процессе химио и иммунотерапии. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Москва 1991г.
8. Aunaud O., Tranbaloc P., Orth G. Lack of evidence for a role of human papillomaviruses in transitional cell carcinoma of the bladder //J. Urol.-1998.-V159.-P.86-90/
9. O'Donnell M.A., Krohn S. Salvage intravesical therapy with interferon-alpha 2b plus low dose bacillus Calmette Guerin is effective in patients with superficial bladder cancer in whom BCG alone previously failed //J. Urol.-2001.- Oct; 166(4).-P.1300-1304.
10. Griffiths T.R., Mellon J.K. Human papillomavirus and urological tumors: 2 Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer //BJU International.-2000.-V.85.-P.211-217.
11. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Citro G. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization //Genes Chromosomes cancer.- 1995.-V.12.-P.213-219.
12. Lamm D.L., Griffiths J.G. et.al. Current perspectives on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer //Urology.-1992.-V.39.-P.301-308.
13. Moyano Calvo J.L., Teba del Pino F., Saus Sacristan J. et.al. Immunoprophylaxis of superficial tumors of the bladder with interferon alpha-2b. Our experience //Arch.Esp.Urol.-1995 Jan-Feb; 48(1), P.55-59.
14. Palefsky J.M., Gonsales J., Greenblatt R.M. Anal intraepithelial neoplasia and papillomavirus infection among homosexual males with group 1V HIV disease //JAMA.- 1990.- Vol.263, No21.- P.2911-2916.
15. Shenkman E., Lamm D.L. //Dig. Urol.J.-<http://www.dvj.com/Article/Shenkman.html>.
16. Spruck C.H., Rideont W.M., Olumi A.F., et.al. Dstinct pattern of p53 mutations of bladder cancer: relationship to tobacco usage //Cancer Res.-1993.-V.53-P.1162-1166.

THE ROLE OF IMMUNOLOGIC INDICES AND PAPILLOMA-VIRAL INFECTION IN SUBSTANTIATION OF ASSOCIATED IMMUNOTHERAPY OF THE SUPERFICIAL URINARY BLADDER CANCER

A.G. Sarankin

The immunologic aspects of the superficial bladder cancer, the interaction of the local and systemic immune processes are considered in the paper. The role of the human papilloma-viruses in the oncologic process has been estimated. The purpose of the systemic interferon therapy in case of superficial urinary bladder cancer has been substantiated.