

Александр Федорович Лазарев<sup>1</sup>, Динара Кумаровна Кенбаева<sup>2</sup>,  
Зухра Алпысбаевна Манамбаева<sup>3</sup>

## КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ В ПРОЦЕССЕ ИММУНОТЕРАПИИ

<sup>1</sup> Профессор, д. м. н., директор, Алтайский филиал РОНЦ им. Н. Н. Блохина  
(656000, РФ, г. Барнаул, ул. Никитина, д. 77)

<sup>2</sup> К. м. н., заведующая, отделение гинекологии, Городской онкологический диспансер г. Астана  
(010000, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Махтумкули, д. 3)

<sup>3</sup> Профессор, д. м. н., заведующая, кафедра онкологии, Государственный медицинский университет г. Семей  
(014700, Республика Казахстан, г. Семей, ул. Абая Кунанбаева, д. 103)

Адрес для переписки: 010000, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Махтумкули, д. 3,  
Городской онкологический диспансер г. Астана, отделение гинекологии,  
Кенбаева Динара Кумаровна, e-mail: dikenb@mail.ru

Для определения особенностей содержания иммунокомпетентных клеток в крови и ткани опухоли у больных раком шейки матки, подвергавшихся иммунотерапии, обследованы 37 больных раком шейки матки III клинической стадии. Женщины были распределены на 2 группы: сочетанной лучевой терапии и ее комбинации с иммунотерапией, осуществляемой путем реинфузии активированных *in vitro* аутолимфоцитов в сочетании с препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 и Флогэнзимом. Исследовано содержание лимфоцитов некоторых кластеров дифференцировки в крови и биоптатах опухоли в динамике лечения. В результате лечения в группе применения иммунотерапии выявлено статистически значимое повышение содержания лимфоцитов и их субпопуляций в крови и ткани опухоли. В наибольшей степени было выражено повышение количества лимфоцитов цитотоксического действия, что, по нашему мнению, отражает активацию противоопухолевых иммунных механизмов.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, иммунотерапия, клеточный иммунитет, интерлейкин-2, системная энзимотерапия.

Иммунотерапия злокачественных новообразований все чаще применяется и становится стандартным методом лечения больных, особенно в экономически развитых странах мира. За несколько десятилетий своего существования она прошла путь от первых экспериментов до включения в число основных и наиболее эффективных способов лечения таких опухолей, как рак почек, легких, яичников, мочевого пузыря [1; 2].

Продолжаются исследования, направленные на создание методов иммунотерапии злокачественных новообразований других локализаций и совершенствование имеющихся подходов с доказанной клинической эффективностью.

Существует обширный спектр методов иммунотерапии опухолей, включающий применение вакцин, сывороток, способов стимуляции клеточного иммунитета как *in vivo*, так и *in vitro*, неспецифические воздействия (иммуностимуляция, иммуномодуляция, иммунокоррекция) на различных уровнях регуляции и эффекторного действия иммунитета [3].

Наиболее разработанным и эффективным направлением до настоящего времени считается вакциноотерапия, чаще всего применяемая при новообразованиях соматических органов. На втором месте находятся методы клеточной иммунотерапии (TIL-терапия, LAK-терапия). В последние годы работы в этой области часто направлены на лечение новообразований, не поддающихся иммунотерапии существующими способами [4; 5].

Проблема иммунотерапии опухолей шейки матки до настоящего времени остается нерешенной. В то же время нет оснований считать данную локализацию не иммуногенной и не подлежащей лечению с применением соответствующих методов. Потенциальной причиной практического отсутствия разработок в области иммунотерапии рака шейки матки (РШМ) представляется преимущественный интерес исследователей к другим аспектам иммунопатогенеза данной опухоли, а именно — ее профилактике за счет вакцинации и лечения вирусных инфекций [6; 7].

Цель исследования — определение особенностей содержания иммунокомпетентных клеток в крови и ткани опухоли у больных РШМ, подвергавшихся иммунотерапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках клинико-иммунологического исследования обследованы 37 больных РШМ III клинической стадии (T1—2N1M0, T3N0—1M0), подвергшихся противоопухолевой терапии (сочетанной лучевой терапии — СЛТ). Все больные были в возрасте от 30 до 70 лет.

Критерии включения: злокачественное образование шейки матки; возраст (30—70 лет); информированное согласие на участие в исследовании, проведение исследований и дополнительных методов лечения.

Критерии исключения: отказ от участия в исследовании на любом этапе; неполнота обследования; злокачественные новообразования других локализаций, выявленные в ходе исследования; соматические заболевания, хронические инфекционные заболевания либо системные заболевания соединительной ткани.

Дистанционную гамма-терапию в статическом или подвижном режиме проводили на область первичной опухоли и зоны возможного параметрального и лимфогенного распространения опухоли, чередуя с сеансами внутримолостной гамма-терапии. Суммарная очаговая доза в точке В от дистанционного облучения составила 40 Гр. Внутримолостное облучение осуществляли методом введения метроксипостатов и радиоактивных источников низкой активности до суммарной очаговой дозы 50—60 Гр в точке А или источников высокой активности (последовательное автоматизированное введение на аппарате «Агат-В» с фракционированием по 5 Гр; всего 10 сеансов).

Все больные были распределены на 2 группы в зависимости от проводимой терапии. В 1-ю группу (основную, или группу иммунотерапии) включены пациентки, получавшие только СЛТ, во 2-ю группу (сравнения) — получавшие СЛТ в сочетании со специфической иммунотерапией (СИТ). Методика СИТ включает инкубацию аутолимфоцитов с опухолевыми антигенами и стимулятором роста Т-лимфоцитов и хелперным фактором для киллеров (интерлейкин-2). Кроме того, применяли адоптивную иммунотерапию (АИТ), заключающуюся в курсе системной энзимотерапии (Флогэнзим, 3 таблетки 3 раза в день в течение 4 нед) в сочетании с препаратом интерлейкина-2, 200 000—250 000 МЕ/кг через 2 сут внутривенно капельно в течение 4 нед. Иммунотерапию начинали одновременно с лучевым лечением.

В крови и предварительно подготовленной взвеси биоптата опухоли определяли число общих Т-лимфоцитов и в зависимости от кластеров дифференцировки методом иммуноферментного анализа на проточном цитометре «Beckman Coulter».

Определяли следующие кластеры лимфоцитов:

- CD3+ — зрелые Т-лимфоциты («Beckman Coulter», № A07746);
- CD3+CD4+ — Т-хелперы («Beckman Coulter», № A07750);
- CD3-CD56+CD16+ — натуральные киллеры («Beckman Coulter», № A07735);
- CD3+CD56+CD16+ — НКТ-клетки («Beckman Coulter», № A07415);
- CD3+CD25+ — активированные Т-лимфоциты на ранней стадии активации («Beckman Coulter», № IM3486U);

- CD95+ — преапоптотические активированные лейкоциты всех кластеров дифференцировки («Beckman Coulter», № IM1504).

По завершении АИТ (1 мес) в крови и тканях опухоли повторно исследовали содержание иммуноцитов указанных выше кластеров дифференцировки. Для решения последней задачи проводили повторную биопсию опухоли под контролем УЗИ.

При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Сравнение количественных признаков проводили с помощью критерия Стьюдента, для непрерывных переменных — с использованием парного критерия Стьюдента. Ограничения применения параметрических методов включали анализ распределения по критерию Колмогорова—Смирнова, а также равенства дисперсий. При несоблюдении критериев применимости параметрических методов использован метод анализа значимости различий по критерию Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные результаты, характеризующие содержание иммунокомпетентных клеток исследованных кластеров дифференцировки в крови обследованных больных, представлены в табл. 1.

В процессе применения обоих методов лечения зарегистрировано снижение содержания в крови общих лимфоцитов, а также клеток всех исследованных кластеров дифференцировки. Различия по абсолютному содержанию лимфоцитов были статистически значимыми только в группе сравнения, в которой иммунотерапия не проводилась. Абсолютное содержание клеток CD3+ было статистически значимо выше в группе иммунотерапии на 38,2% ( $p < 0,05$ ), хотя процентные показатели статистически значимо не различались между группами. В несколько меньшей степени различалось абсолютное содержание клеток CD3+CD4+ (27,5%;  $p < 0,05$ ).

Динамика содержания клеток субпопуляций киллеров в исследуемых группах была разнонаправленной. Отмечалось снижение данного показателя в группе сравнения и значимое повышение (на 87,5% по абсолютному и на 48,1% по относительному показателям) в группе иммунотерапии. В еще большей степени различалось содержание клеток CD3+CD56+CD16+ (НКТ-клетки). Абсолютное содержание этих клеток в группе иммунотерапии превышало таковое в группе сравнения в 2,5 раза, а относительное — в 2 раза ( $p < 0,01$  во всех случаях).

Выявлены статистически значимое снижение абсолютного содержания и тенденция к уменьшению относительного содержания клеток CD3+CD25+ в крови у пациентов группы сравнения. Напротив, в основной группе как абсолютное, так и относительное содержание клеток данного кластера увеличивалось, причем относительное число указанных клеток было статистически значимо больше, чем в группе сравнения. Отмечено также значимое увеличение числа клеток CD95+ у больных группы сравнения на фоне лечения. В основной группе такая динамика отсутствовала.

Однако содержание Т-лимфоцитов различных кластеров дифференцировки в крови не отражает функ-

Таблица 1

**Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ III стадии в ходе лечения**

| Показатель                              | Группа сравнения |                   | Группа иммунотерапии |                       |
|-----------------------------------------|------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
|                                         | исходно          | лечение           | исходно              | лечение               |
| Лимфоциты общие, $\times 10^9/\text{л}$ | $2,26 \pm 0,11$  | $1,53 \pm 0,10^a$ | $2,19 \pm 0,13$      | $1,95 \pm 0,09^b$     |
| CD3+, $\times 10^9/\text{л}$            | $1,75 \pm 0,08$  | $1,02 \pm 0,06^a$ | $1,69 \pm 0,07$      | $1,41 \pm 0,06^{a,b}$ |
| CD3+, %                                 | $77,4 \pm 3,0$   | $66,7 \pm 3,4^a$  | $77,1 \pm 4,0$       | $72,3 \pm 2,9$        |
| CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$        | $0,97 \pm 0,06$  | $0,69 \pm 0,06^a$ | $0,95 \pm 0,04$      | $0,88 \pm 0,05^b$     |
| CD3+CD4+, %                             | $42,9 \pm 2,3$   | $45,1 \pm 3,0$    | $43,2 \pm 2,8$       | $45,1 \pm 2,4$        |
| CD3–CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$  | $0,13 \pm 0,01$  | $0,08 \pm 0,01^a$ | $0,12 \pm 0,01$      | $0,15 \pm 0,01^{a,b}$ |
| CD3–CD56+CD16+, %                       | $5,8 \pm 0,5$    | $5,2 \pm 0,4$     | $5,5 \pm 0,3$        | $7,7 \pm 0,4^{a,b}$   |
| CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$  | $0,05 \pm 0,01$  | $0,04 \pm 0,01$   | $0,05 \pm 0,01$      | $0,10 \pm 0,01^{a,b}$ |
| CD3+CD56+CD16+, %                       | $2,6 \pm 0,2$    | $2,5 \pm 0,1$     | $2,4 \pm 0,1$        | $5,1 \pm 0,3^{a,b}$   |
| CD3+CD25+, $\times 10^9/\text{л}$       | $0,17 \pm 0,01$  | $0,11 \pm 0,01^a$ | $0,16 \pm 0,02$      | $0,20 \pm 0,01$       |
| CD3+CD25+, %                            | $7,5 \pm 0,7$    | $7,2 \pm 0,6$     | $7,4 \pm 0,5$        | $10,3 \pm 0,5^{a,b}$  |
| CD95+, $\times 10^9/\text{л}$           | $1,29 \pm 0,08$  | $1,15 \pm 0,07$   | $1,27 \pm 0,11$      | $1,12 \pm 0,06$       |
| CD95+, %                                | $57,7 \pm 3,3$   | $75,4 \pm 4,3^a$  | $58,5 \pm 3,9$       | $57,4 \pm 3,0^b$      |

<sup>a</sup> Статистически значимые различия по сравнению с исходным уровнем ( $p < 0,05$ ).<sup>b</sup> Статистически значимые различия между группами в процессе лечения ( $p < 0,05$ ).

циональные способности клеток в плане формирования противоопухолевого ответа.

Некоторые исследователи считают существенными содержание иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухоль [8], и их состав. Соответствующее исследование проведено нами в отношении лимфоцитов тех же кластеров (табл. 2).

Следует отметить, что число лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в ходе лечения увеличивалось, однако в разной степени в зависимости от применявшихся методов терапии. Превышение над исходным показателем в группе сравнения составило 46,9% ( $p < 0,05$ ), а в группе иммунотерапии — 163,3% ( $p < 0,01$ ); различия между группами достигали 68,3% ( $p < 0,05$ ). В определенной степени различался и состав лимфоцитов, выделенных из биопсийного материала РШМ. По относительному числу клеток CD3+ и лимфоцитов CD3+CD4+ существенных различий между группами не было, тогда как содержание лимфоцитов киллерных субпопуляций значительно увеличивалось только в группе иммунотерапии. Различия с исходным уровнем по относительному числу клеток CD3–CD56+CD16+ составили 40,8%, с группой сравнения — 43,6% ( $p < 0,05$  в обоих случаях). Для клеток

CD3+CD56+CD16+ соответствующие относительные значения составляли 43,4 и 26,6% ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, увеличение числа клеток, оказывающих известный цитотоксический эффект, по сравнению с исходным уровнем было характерно только для группы, в которой применяли сочетание СИТ и АИТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные подходы к клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований чаще всего предполагают использование полученных от больного активированных лимфокинами киллеров (ЛАК-терапия), реинфузию лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL-терапия) [9].

«Классические» формы TIL- и ЛАК-терапии, как мы полагаем, могут быть совмещены, что будет способствовать достижению большего эффекта. Так, стимуляция иммунокомпетентных клеток *in vitro* позволяет исключить подавляющее влияние на них специфической противоопухолевой терапии. Получение значительного количества клеток без хирургического вмешательства возможно только из крови. Однако представляется вполне адекватным помещение их в условия, сходные с

Таблица 2

**Сравнительная характеристика содержания иммуноцитов различных кластеров дифференцировки в тканях опухоли**

| Показатель                        | Группа сравнения |                 | Группа иммунотерапии |                      |
|-----------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|----------------------|
|                                   | исходно          | после лечения   | исходно              | после лечения        |
| Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ | $3,2 \pm 0,2$    | $4,7 \pm 0,3^a$ | $3,0 \pm 0,2$        | $7,9 \pm 0,4^{a,b}$  |
| CD3+, %                           | $61,4 \pm 3,2$   | $64,9 \pm 3,4$  | $59,2 \pm 2,9$       | $68,0 \pm 3,5$       |
| CD3+CD4+, %                       | $43,5 \pm 2,8$   | $48,2 \pm 3,0$  | $42,1 \pm 2,2$       | $50,3 \pm 2,5^a$     |
| CD3–CD56+CD16+, %                 | $15,5 \pm 1,1$   | $14,9 \pm 0,9$  | $15,2 \pm 1,2$       | $21,4 \pm 1,7^{a,b}$ |
| CD3+CD56+CD16+, %                 | $11,7 \pm 0,7$   | $12,8 \pm 0,9$  | $11,3 \pm 0,6$       | $16,2 \pm 1,0^{a,b}$ |

<sup>a</sup> Статистически значимые различия по сравнению с исходным уровнем ( $p < 0,05$ ).<sup>b</sup> Статистически значимые различия между группами в процессе лечения ( $p < 0,05$ ).

теми, в которых находятся клетки, инфильтрирующие опухоль, путем добавления в среду гомогената ткани новообразования. На этом фоне стимуляция дифференцировки цитокинами является «последним штрихом», способствующим значительному потенцированию эффекта. Наличие в инкубационной среде комплекса различных иммунокомпетентных клеток крови также может способствовать повышению эффективности относительно ЛАК-терапии ввиду возможности межклеточной кооперации и взаимной стимуляции.

Доказательством активации клеточного противоопухолевого иммунитета, по нашему мнению, служит одновременное повышение содержания цитотоксических клеток в крови (вероятно, за счет стимуляции их дифференцировки в результате воздействия клеточных факторов, выработанных при инкубации *in vitro*), а в еще большей степени — значимое превышение их в структуре клеток, инфильтрирующих опухоль.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Perez C. A., Santos E. S., Raez L. E. Active immunotherapy for non-small-cell lung cancer: moving toward a reality // *Expert. Rev. Anti-cancer Ther.* — 2011. — Vol. 11, N 10. — P. 1599–1605.
2. Seremet T., Brasseur F., Coulie P. G. Tumor-specific antigens and immunologic adjuvants in cancer immunotherapy // *Cancer J.* — 2011. — Vol. 17, N 5. — P. 325–330.

3. Козлов В. К., Молчанов О. Е., Жаринов Г. М. Иммуноterapia рекомбинантными цитокинами в лечении онкологических больных // *Успехи клинической иммунологии и аллергологии. Том III* / Под ред. А. В. Караулова. — М.: Изд-во регионального отделения РАЕН, 2002. — С. 263–279.

4. Immunotherapy of prostate cancer: identification of new treatments and targets for therapy, and role of WAP domain-containing proteins / Galustian C., Vyakarnam A., Elhage O., Hickman O., Dasgupta P., Smith R. A. // *Biochem. Soc. Trans.* — 2011. — Vol. 39, N 5. — P. 1433–1436.

5. Thibodeaux S. R., Curiel T. J. Immune therapy for ovarian cancer: promise and pitfalls // *Int. Rev. Immunol.* — 2011. — Vol. 30, N 2–3. — P. 102–119.

6. Human papillomavirus vaccines: new tools for accelerating cervical cancer prevention in developing countries / Luciani S., Jauregui B., Kieny C., Andrus J. K. // *Immunotherapy.* — 2009. — Vol. 1, N 5. — P. 795–807.

7. Tay S. K. Cervical cancer in the human papillomavirus vaccination era // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* — 2012. — Vol. 24, N 1. — P. 3–7.

8. Субпопуляции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов серозной аденокарциномы яичников / Каирбаева М. Ж., Зуева Е. В., Моженкова А. В., Кокосадзе Н. В., Никогосян С. О., Тупицын Н. Н. // *Тез. докл. Академии наук.* — 2009. — Т. 429, № 1. — С. 115–119.

9. Yannelli J. R., Wroblewski J. M. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy // *Vaccine.* — 2004. — Vol. 23, N 1. — P. 97–113.

Поступила 16.07.2012

*Alexander Fedorovich Lazarev<sup>1</sup>, Dinara Kumarovna Kenbayeva<sup>2</sup>,  
Zukhra Alpysbayevna Manambayeva<sup>3</sup>*

## **CELL-MEDIATED IMMUNITY IN PATIENTS WITH CERVICAL CANCER ON IMMUNOTHERAPY**

<sup>1</sup> MD, PhD, DSc, Professor, Director, Altai Affiliation, N. N. Blokhin RCRC, RAMS  
(77, ul. Nikitina, Barnaul, RF, 656000)

<sup>2</sup> MD, PhD, Head, Gynecology Department, Astana City Cancer Clinic  
(3, ul. Makhmukuli, Astana, Republic of Kazakhstan, 010000)

<sup>3</sup> MD, PhD, DSc, Head, Oncology Chair, Semey State Medical University  
(103, ul. Abaya Kunanbayeva, Semey, Republic of Kazakhstan, 014700)

Address for correspondence: Kenbayeva Dinara Kumarovna, Gynecology Department,  
Astana City Cancer Clinic, 3, ul. Makhmukuli, Astana, Republic of Kazakhstan, 010000;  
e-mail: dikenb@mail.ru

A total of 37 patients with stage III cervical cancer were examined to determine specific features in contents of blood and tumor tissue immunocompetent cells in cervical cancer patients receiving immunotherapy. The females were divided into 2 groups depending on receiving radiotherapy or combined radio- and immunotherapy by reinfusion of *in vitro* activated autolymphocytes plus recombinant interleukin-2 and Flogenzyme. Changes in contents of some lymphocyte differentiation clusters in blood and tumor biopsies were studied during treatment. After treatment completion the immunotherapy group demonstrated a statistically significant increase in levels of lymphocytes and their populations in blood and tumor tissue. Increase in cytotoxic lymphocyte levels was most marked which was suggestive of activation of antitumor immunity mechanisms.

**Key words:** cervical cancer, immunotherapy, cellular immunity, interleukin-2, systemic enzyme therapy.