Р.К. Тащиев
И.В. Абраменко
В.А. Шляховенко
Ашраф Авад Эль Карим

Киевская медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика МЗ Украины

Научный центр радиационной медицины АМН Украины

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: *рак молочной железы, криодеструкция, операция, противоопухолевая аутовакцина, побочные эффекты, иммунологические показатели, клинические результаты.*

ВЛИЯНИЕ КРИОДЕСТРУКЦИИ С АУТОВАКЦИНАЦИЕЙ НА НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. *Криодеструкция опухоли с последующей операцией и криоаутовакцинацией проведена 22 больным раком молочной железы (стадия IIа (T1-2N0-1M0) — 5, IIб (T2-3N0-1M0) — 9, IIIа (T2-3N2M0) — 7 и IIIб (T4N0-3M0) — 1 пациентке). Комплексное лечение не обусловливало развития системных и местных побочных реакций, сопровождалось достоверным снижением концентрации антигена CA15-3 в сыворотке крови, возрастанием хелперно-супрессорного соотношения, тенденцией к увеличению количества CD3+- и CD4+-Т-лимфоцитов, развитием реакции гиперчувствительности замедленного типа и появлением сывороточных антител к компонентам вакцины. На протяжении 12–28 мес наблюдения все больные живы, признаки рецидива не выявлены. Сделан вывод о перспективности продолжения подобных исследований.*

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос иммунотерапии по поводу злокачественных новообразований в последнее время пристально изучается в связи с растущим числом доказательств наличия на клетках опухолей различного происхождения опухольассоциированных антигенов (ОАг) и возможности развития специфического противоопухолевого иммунного ответа [1–6].

Выявлено существование клонов лимфоцитов, специфически распознающих и лизирующих опухолевые клетки (ОК), разрабатываются новые подходы к проведению вакцинации больных онкологического профиля [7–9]. К ним относятся получение и активация дендритных клеток, нагруженных пептидами ОАг [10] или мРНК, полученной из ОК [11]; иммунизация гибридными клетками, полученными в результате слияния аллогенных дендритных и ОК больного [12, 13]; введение дендритных клеток, ОАг или их пептидов в комплексе с различными цитокинами и/или факторами роста, способствующими привлечению Т-лимфоцитов в очаг иммунизации и их активации и т.д. [14, 15].

Одним из подходов к активации иммунного противоопухолевого ответа может быть криогенное воздействие на опухолевую ткань. Отмечено, что после криовоздействия на крупные опухолевые узлы в печени полностью рассасываются мелкие метастатические злокачественные образования печени, не подвергавшиеся криовоздействию [16, 17]. Нами обнаружено, что в результате криовоздействия в ткани опухоли уменьшается содержание белков с мол. м. 40–200 кДа и одновременно происходит накопление гликопептидов с мол. м. 12 кДа [18]. В эксперименте на животных показана значительно большая иммуногенность гликопептидов, полученных из криомодифицированной опухолевой ткани, по сравнению с гликопептидами немодифицированной опухоли. Эти данные послужили основой для создания противоопухолевой аутовакцины (ПАВ) методом криовоздействия на ткань опухоли с последующей обработкой ее протеолитическим ферментом, фракционированием гидролизата и очищением полученных гликопептидов [19].

Криодеструкция опухолевой ткани, оперативное вмешательство и последующая вакцинация с использованием ПАВ были включены в комплекс лечебно-профилактических мероприятий у 10 больных раком молочной железы (РМЖ). Оценивали некоторые параметры клеточного и гуморального ответа у этих больных в сравнении с группой пациентов, которым проводили криодеструкцию опухолевой ткани с последующим оперативным удалением ткани опухоли, а также с больными, получившими только оперативное лечение.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1-ю группу составили 22 больных в возрасте от 42 до 61 года (в среднем — 49,6 ± 2,1 года) с гистологически верифицированным РМЖ. По стадиям заболевания больных распределяли следующим образом: стадия IIа (T1-2N0-1M0) — 5, IIб (T2-3N0-1M0) — 9, IIIа (T2-3N2M0) — 7 и IIIб (T4N0-3M0) — 1. Всем пациенткам основной группы было проведено криовоздействие на опухоль с последующей мастэктомией по Холстеду. Из фрагмента удаленной опухоли на базе Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого готовили ПАВ согласно ранее описанной методике [19]. Курс вакцинации проводили через 3–4 нед после опера-

ции. Вакцину вводили внутрикожно 1 раз в нед в дозе 1 мл (эквивалент 1 млн клеток), всего 3 введения.

Во 2-ю группу включены 32 пациентки с РМЖ в возрасте 50,0 ± 3,5 года (37–65 лет): со стадией IIа (T1-2N0-1M0) — 6, IIб (T2-3N0-1M0) — 7, IIIа (T2-3N2M0) — 15 и IIIб (T4N0-3M0) — 4 больных. В этой группе схема лечения предусматривала криовоздействие на опухоль с последующей операцией (у 4 — квадрантэктомия, у 9 — мастэкстомия по Холстеду, у 19 — по Пейти). Вакцинацию больным этой группы не проводили.

В качестве контрольной группы обследованы 23 больных в возрасте от 28 до 75 лет со IIб (T2-3N0-1M0) стадией заболевания, которым было проведено только оперативное вмешательство с последующей полихимиотерапией и/или лучевой терапией без криодеструкции опухолевой ткани и вакцинации.

Клинико-лабораторное обследование проводили непосредственно перед оперативным вмешательством, перед вакцинацией, а также через 4 мес после третьего введения аутовакцины (больным 1-й группы) или через 6 мес после операции (больным 2-й и контрольной групп). В сыворотке крови определяли уровень сывороточных иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM) методом простой радиальной диффузии, а также содержание ОАг CA15-3 иммуноферментным методом [20–22]. Субпопуляции иммунокомпетентных клеток исследовали на базе отдела клинической иммунологии Научного центра радиационной медицины АМН Украины методом лазерной проточной цитофлюориметрии в прямом иммунофлюориметрическом тесте с помощью панели моноклональных антител серии Leu («Becton Dickinson», США). Изучали экспрессию антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56.

Для исследования специфического противоопухолевого иммунитета изучали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ). С этой целью в области предплечья проводили скарификационную пробу. Внутрикожно вводили 0,1 мл стерильного лизата, приготовленного из 100 тыс. ОК. Реакцию оценивали через 24 ч после введения, измеряя диаметр образовавшейся папулы.

Для исследования образования антител, направленных к антигенным детерминантам вводимой ПАВ, использовали метод радиальной диффузии. В раствор агара добавляли ПАВ (к 5 мл агара — 0,1 мл вакцины в физиологическом растворе, эквивалент 1 млн клеток), в лунки — растворы анализируемых сывороток в разведениях 1 : 2; 1 : 4; 1 : 8; 1 : 16 и 1 : 32.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Медиана наблюдения за больными 1-й группы составила 12 мес. На протяжении периода наблюдения все больные живы, признаки рецидива основного заболевания отсутствуют. Вакцинация перенесена больными хорошо и не сопровождалась развитием каких-либо местных или системных побочных явлений. Во 2-й группе (медиана наблюдения 33 мес, разброс 21–44 мес) 1 больная погибла вследствие прогрессирования основного заболевания через 21 мес после операции. У остальных пациенток признаки рецидива отсутствуют. В контрольной группе на протяжении 24 мес наблюдения умерли 3 пациентки от прогрессирования основного заболевания, еще у 1 развился рецидив РМЖ.

Динамика изменения сывороточных маркеров в послеоперационный период у больных 1-й группы была позитивной. Уже через 1 мес после проведения криодеструкции и удаления опухоли концентрация опухольассоциированного антигена CA15-3 в сыворотке крови снизилась с 36,81 ± 4,81 до 23,37 ± 3,93 нг/мл ($p < 0,02$). При повторном исследовании через 4 мес после окончания курса вакцинации (6 мес после проведения операции) концентрация CA15-3 в сыворотке крови сохранялась на таком же низком уровне (23,63 ± 4,81 нг/мл, $p < 0,02$). Ни у одной больной в динамике не отмечали повышения уровня сывороточного маркера.

У больных контрольной группы достоверного снижения CA15-3 в сыворотке крови через 1 и 6 мес после операции, в отличие от больных 1-й группы, не выявлено (34,19 ± 5,50 и 27,43 ± 4,20 нг/мл; $p > 0,05$ по сравнению с исходным уровнем — 35,52 ± 4,06 нг/мл). Кроме того, у 5 больных контрольной группы отмечен рост концентрации CA15-3 (рис. 1).

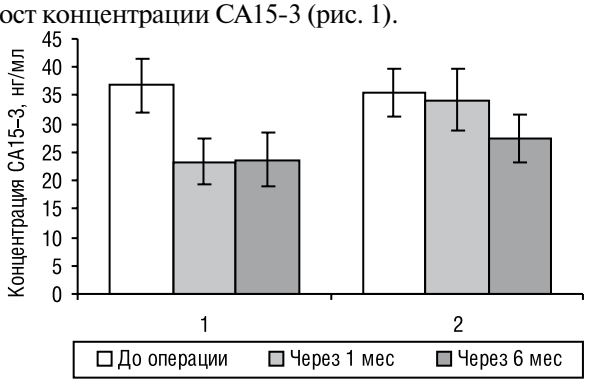

Рис. 1. Концентрация ОАг CA15-3 в сыворотке крови больных 1-й (1) и контрольной группы (2)

Существенных изменений общего уровня лейкоцитов, относительного и абсолютного содержания лимфоцитов у больных 1-й, 2-й и контрольной групп не выявлено (рис. 2). Следует отметить, что при исследовании клеточного состава периферической крови ни в одном случае не возрастало и относительное содержание эозинофилов.

Не выявили достоверных изменений субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных контрольной группы. В то же время у пациенток, которым была проведена криодеструкция опухолевой ткани, в особенности 1-й группы, отмечена выраженная тенденция к повышению содержания $CD3^+$-Т-лимфоцитов ($p = 0,09$ в 1-й группе) и $CD4^+$-Т-лимфоцитов-хелперов ($p = 0,07$ в 1-й группе). Это привело к достоверному возрастанию хелперно-супрессорного соотношения как в 1-й, так и 2-й

группе. Содержание $CD8^+$-Т-лимфоцитов-супрессоров, $CD19^+$ В-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров ($CD3^-CD56^+CD16^+$), Т-лимфоцитов с цитотоксической активностью ($CD3^+CD56^+CD16^+$) у пациенток, которым выполнили криодеструкцию, не изменялось. Не установлено также изменений концентрации сывороточных иммуноглобулинов различных классов (таблица).

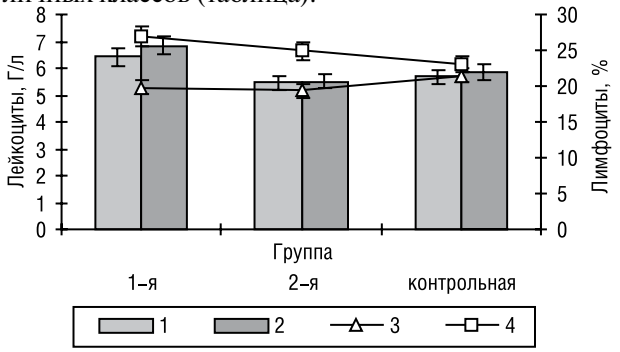

Рис. 2. Содержание лейкоцитов и лимфоцитов у больных 1-й, 2-й и контрольной группы до и через 6 мес после оперативного вмешательства: 1 — исходное содержание лейкоцитов; 2 — показатели повторного исследования содержания лейкоцитов; 3 — исходное содержание лимфоцитов; 4 — показатели повторного исследования содержания лимфоцитов

В то же время у больных 1-й группы выявлены некоторые признаки появления специфической иммунной реакции на вводимые компоненты вакцины, в первую очередь — РГЗТ. Если исходный диаметр папулы составил в среднем по группе 7,28 ± 2,16 мм, то через 2 мес после вакцинации — 18,58 ± 2,49 мм ($p < 0,03$). Только у 1 больной данная проба была негативной.

Специфическая реакция на компоненты вакцины со стороны гуморального иммунитета, оцененная у 6 пациенток 1-й группы в реакции преципитации методом радиальной диффузии, отмечена у всех 6 больных. У них выявлено значительное возрастание диаметра колец преципитации при исследовании образцов сыворотки, полученных после окончания вакцинации, по сравнению с исходными. У 3 пациенток диаметр колец преципитации при исходном и повторном исследовании сывороток не различался, еще у 1 пациентки преципитат, образованный компонентами исходной сыворотки, по сравнению с повторным образцом был больше (рис. 3).

Таким образом, результаты исследования предложенного комплекса лечения больных РМЖ, включающего проведение криодеструкции опухолевой ткани, удаление опухоли и последующую вакцинацию с помощью ПАВ, убедительно свидетельствуют о его эффективности. Все больные на протяжении 12 мес наблюдения живы, и признаков рецидива заболевания не выявлено. Применение предложенного комплекса не сопровождалось развитием местных или системных побочных явлений. По сравнению с контрольной группой больных, которым выполнено только оперативное вмешательство, динамика снижения концентрации ОАг СА15-3 в сыворотке крови была более выраженной. Это свидетельствует в пользу протекторного противоопухолевого действия проведенной криодеструкции и последующей вакцинации. Результаты лабораторных исследований подтверждают развитие иммунологической реакции на компоненты вводимой ПАВ (положительная РГЗТ, взаимодействие сыворотки крови иммунизированных больных с компонентами ПАВ, динамика показателей клеточного иммунитета). Таким образом, криодеструкция опухолевой ткани и последующая аутовакцинация могут быть рекомендованы для более широкого применения в клинической практике, что позволит оценить возможности данного метода для продления общей и безрецидивной выживаемости РМЖ.

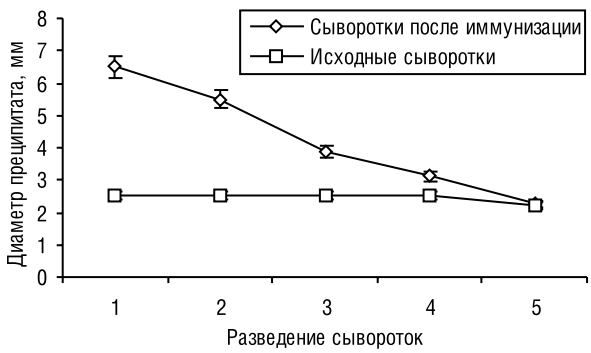

Рис. 3. Результаты реакции преципитации при исследовании взаимодействия сывороток больных, полученных до начала и через 4 мес после проведения иммунизации, с компонентами вводимой вакцины. Разведения сывороток: 1 : 2 (1); 1 : 4 (2); 1 : 8 (3); 1 : 16 (4) и 1 : 32 (5)

ВЫВОДЫ

1. Разработанный комплексный подход к лечению РМЖ, включающий криовоздействие на опу-

Таблица

Некоторые показатели клеточного и гуморального иммунитета у обследованных больных

Показатель	Группа					
	контрольная		1-я		2-я	
	1	2	1	2	1	2
$CD19^+$-клетки, %	13,8 ± 1,02	12,98 ± 1,11	10,96 ± 1,32	11,22 ± 1,42	11,65 ± 3,43	10,23 ± 2,68
$CD3^+$-клетки, %	53,01 ± 1,75	55,21 ± 2,19	52,62 ± 2,84	62,81 ± 2,46	55,22 ± 3,98	60,15 ± 2,42
$CD4^+$-клетки, %	32,29 ± 2,13	35,96 ± 2,19	32,68 ± 2,94	40,02 ± 2,56	35,73 ± 3,24	37,73 ± 2,14
$CD8^+$-клетки, %	24,62 ± 2,03	26,02 ± 2,12	24,34 ± 2,71	26,07 ± 1,86	26,31 ± 2,78	24,32 ± 2,34
Соотношение CD4/CD8	1,32 ± 0,05	1,34 ± 0,04	1,34 ± 0,08	1,53 ± 0,07*	1,34 ± 0,08	1,54 ± 0,06*
$CD3^-CD56^+CD16^+$-клетки, %	14,72 ± 1,34	15,08 ± 1,78	15,50 ± 1,86	14,65 ± 2,05	13,93 ± 2,94	17,25 ± 3,37
$CD3^+CD56^+CD16^+$-клетки, %	9,67 ± 1,12	8,56 ± 1,65	12,05 ± 1,27	8,85 ± 1,34	10,12 ± 2,15	7,77 ± 1,47
IgA, г/л	1,86 ± 0,08	1,92 ± 0,09	1,92 ± 0,15	1,89 ± 0,12	1,79 ± 0,09	1,96 ± 0,17
IgM, г/л	1,24 ± 0,03	1,28 ± 0,04	0,92 ± 0,02	1,22 ± 0,07	1,04 ± 0,13	1,14 ± 0,06
IgG, г/л	10,22 ± 0,27	9,87 ± 0,33	9,47 ± 0,32	10,45 ± 0,28	10,33 ± 0,42	9,80 ± 0,62

Примечания: 1 – исходные данные, 2 – повторное исследование через 6 мес после оперативного вмешательства; *различия достоверны при $p < 0,05$ между исходными и повторными исследованиями в анализируемых группах.

холевую ткань с последующей операцией и аутовакцинацией, хорошо переносится пациентками, не вызывает прогрессирования основного заболевания, развития общих и системных побочных явлений, приводит к достоверному снижению уровня ОАг СА15-3 в сыворотке крови.

2. При проведении криодеструкции опухолевой ткани и последующей аутовакцинации отмечены признаки специфической иммунной реакции на компоненты вакцины, а именно — развитие РГЗТ и появление антител в сыворотке крови.

3. Полученные клинические результаты исследования свидетельствуют о выраженном иммунном ответе организма в целом на криовоздействие, то есть о противоопухолевой эффективности последнего.

4. Криодеструкция опухоли, а также криодеструкция с последующей вакцинацией могут быть рекомендованы для широкого внедрения в клиническую практику комплексного лечения больных РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, *et al.*** A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma. J Exp Med 1995; **182**: 689–94.

2. **Ditzel HJ, Strik MC, Larsen MK.** Cancer-associated cleavage of cytokeratin 8/18 heterotypic complexes exposes a neoepitope in human adenocarcinomas. J Biol Chem 2002; **277** (24): 21712–22.

3. **Fong L, Hou Y, Rivas A, *et al.*** Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA 2001; **98** (15): 8809–14.

4. **Tamura M, Nishizaka S, Maeda Y, *et al.*** Identification of cyclophilin B-derived peptides capable of inducing histocompatibility leukocyte antigen-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes. Jpn J Cancer Res 2001; **92** (7): 762–7.

5. **Затула ДГ.** Микроорганизмы, рак и противоопухолевый иммунитет. К: Наук думка, 1985. 247 с.

6. **Колесник ЕА, Потебня ГП, Кикоть ВА.** Противоопухолевая аутовакцина в лечении больных с распространенным колоректальным раком. Онкология 1999; **2**: 104–8.

7. **Maeda Y, Ito M, Harashima N, *et al.*** Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)-derived peptides can induce HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in the majority of gastrointestinal cancer patients. Int J Cancer 2002; **99** (3): 409–17.

8. **Correale P, Sabatino M, Cusi MG, *et al.*** In vitro generation of cytotoxic T-lymphocytes against HLA-A2.1-restricted peptides derived from human thymidylate synthase. J Chemother 2001; **13** (5): 519–26.

9. **Гриневич ЮА, Храновская НН.** Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями. Журн АМН України 2003; **4**: 736–53.

10. **Osman Y, Takahashi M, Zheng Z, *et al.*** Activation of autologous or HLA-identical sibling cytotoxic T lymphocytes by blood derived dendritic cells pulsed with tumor cell extracts. Oncol Rep 1999; **6** (5): 1057–63.

11. **Zeis M, Siegel S, Wagner A, *et al.*** Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. J Immunol 2003; **170** (11): 5391–7.

12. **Trefzer U, Walden P.** Hybrid-cell vaccines for cancer immune therapy. Mol Biotechnol 2003; **25** (1): 63–9.

13. **Li J, Holmes LM, Franek KJ, *et al.*** Purified hybrid cells from dendritic cell and tumor cell fusions are superior activators of antitumor immunity. Cancer Immunol Immunother 2001; **50** (9): 456–62.

14. **Gabriele L, Borghi P, Rozera C, *et al.*** IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. Blood 2004; **103** (3): 980–7.

15. **Возианов АФ, Бутенко АК, Зак КП.** Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. К: Наук думка, 1998. 317 с.

16. **Тащиев РК, Мясоедов ДВ, Улубабов РС, Рафаловский ВА.** Криодеструктор для криовоздействия на новообразования печени. АС № 1704773. 15 сентября 1991 г.

17. **Тащиев РК.** Комбинированное лечение новообразований печени с использованием криодеструкции и эндоваскулярной хирургии [Дис ... д-ра мед наук]. 1992. 264 с.

18. **Тащиев РК, Абраменко ИВ, Шляховенко ВА, Ашраф Авад Эль Карим.** Образование низкомолекулярных полипептидов как следствие криовоздействия на ткани опухоли и возможный фактор формирования противоопухолевого иммунитета. Онкология 2003; **5** (2): 133–4.

19. **Шляховенко ВО, Тащієв РК, Ашраф Авад Эль Карим та ін**. Патент України № 70240 на винахід «Спосіб одержання протипухлинної аутовакцини». Бюл № 9, 15.09.2004.

20. **Mancini G, Carbonaria AO, Hermans IE.** Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion. Immunochem 1965; **2** (3): 235–6.

21. Антитела. Методы /Под ред Д Кетти/ М.: Мир, 1991. Кн 2. 384 с.

22. Оценка иммунного статуса человека при массовых обследованиях. Метод рекомендации. М: Минздрав СССР, 1989. 44 с.

EFFECT OF CRYODESTRUCTION WITH AUTO-VACCINATION ON SOME PARAMETERS OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN BREAST CANCER

R.K. Taschiev, I.V. Abramenko, V.A. Shlyakhovenko, Ashraf Avad El Karim

Summary. *Tumor cryodestruction with subsequent surgery and cryoautovaccination was performed in 22 breast cancer patients, including 5 at stage IIa (T1-2N0-1M0); 9 at stage IIb (T2-3N0-1M0), 7 at stage IIIa (T2-3N2M0); and 1 at stage IIIb (T4N0-3M0). Patients tolerated the combined treatment without general and local side effects and resulted in a significantly decreased concentration of CA15-3 antigen in the blood serum, increased helper-to-suppressor ratio, tendency to increased numbers of $CD3^+$- and $CD4^+$-T lymphocytes, development of delayed-type hypersensitivity and appearance of serum antibodies to the vaccine's components. Over the follow-up period (12 to 28 months) all patients were alive with no signs of relapse. These findings suggest that it is promising to continue investigation in this direction.*

Key Words: breast cancer, cryodestruction, surgery, anti-tumor autovaccine, side effects, immunological indices, clinical results.

Адрес для переписки:
Тащиев Р.К.
04112, Киев, ул. Дорогожицкая, 9
Киевская медицинская академия
последипломного образования
им. П.Л. Шупика МЗ Украины