

В.Л. Валецкий

В.Э. Орел

Ю.А. Гриневиц

В.А. Черный

М.И. Данко

Н.Н. Дзятковская

Институт онкологии
АМН Украины, Киев, Украина**Ключевые слова:** рак желудка, послеоперационная иммунотерапия, иммунограмма, годовичная выживаемость.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Резюме. Проведена послеоперационная иммунотерапия больных раком желудка с применением механохимически-радиационно модифицированной аутовакцины. Установлено, что через 6 мес после иммунотерапии у больных нормализовался субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, в частности, увеличилось количество $CD8^+$ -клеток и восстановилось до уровня нормы соотношение $CD4^+/CD8^+$. Годичная выживаемость больных, которым проводили иммунотерапию, была на 33% выше, чем больных контрольной группы (после только хирургического лечения).

ВВЕДЕНИЕ

Характерными для онкопатологии являются широкий полиморфизм нарушений иммунной системы и возможность как иммунологического подавления, так и иммуностимуляции роста опухоли. Антигенная структура и состав клеточной поверхности определяются во многом ее топологическими свойствами в целом и механохимическими свойствами ее отдельных участков. Антигенная атипия проявляется в структуре отдельных клеток, формирующих опухоль, и влияет на ее общую архитектуру. Две опухоли (даже одного вида) генетически не идентичны, поэтому попытки лечения больных онкологического профиля с помощью иммунизации девитализированными опухолевыми клетками дают весьма противоречивые и в большинстве случаев неутешительные результаты [1]. Американский ученый Эдельман выдвинул концепцию, согласно которой иммунные реакции в организме могут регулироваться за счет передачи молекулами клеточной адгезии циклических механохимических сигналов с поверхности к ядру лимфоидных клеток, что вызывает экспрессию или репрессию генов, ответственных за синтез иммуноактивных веществ [2]. Известно, что физико-химическую и биологическую активность, обусловленную ферментативными и свободнорадикальными процессами, можно механохимически регулировать. Механохимические процессы приводят к химическим превращениям, которые, как правило, изменяют форму и структуру макромолекул [3]. По результатам проведенных ранее экспериментальных исследований установлено, что иммунизация предварительно механохимически модифицированными сингенными опухолевыми клетками интенсивно ингибирует рост и метастазирование карциномы Льюис у мышей линии C57BL/6. При этом регистри-

ровали повышение адгезивной и свободнорадикальной активности механохимически модифицированных опухолевых клеток [4]. В противоопухолевой иммунотерапии (ИТ) часто используют и радиационную девитализацию клеточных вакцин [5]. Предварительная механохимическая модификация таких вакцин может, на наш взгляд, повышать концентрацию свободных радикалов и адгезивность после воздействия ионизирующей радиации [6]. Согласно современным представлениям, наиболее вероятной мишенью ИТ могут быть процессы метастазирования [7–9] при условии максимального удаления из организма массы опухолевых клеток.

Цель работы — оценка возможности повышения эффективности хирургического лечения больных раком желудка (РЖ) путем послеоперационного введения механохимически-радиационно модифицированной аутовакцины (МРМА), полученной из удаленной опухоли.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Послеоперационную ИТ с помощью МРМА провели 7 больным РЖ (6 мужчин в возрасте от 37 лет до 61 года и 1 женщина в возрасте 52 года), которые составили основную группу. На основании результатов комплексного обследования, включавшего морфологическую верификацию диагноза после операции, у 4 больных установлена стадия pT3N0M0; у 3 — pT4N1—2M0. Умереннодифференцированный железистый рак (g 2) диагностирован у 2 больных; низкодифференцированный железистый рак (g 3) — у 3; недифференцированный аденогенный рак (g 4) — у 2. В 4 случаях отмечен эндофитный тип роста опухоли, в 3 — экзофитный. В 5 случаях опухоль локализовалась в средней и нижней трети желудка, в 1 случае — в верхней трети, в 1 — в нижней трети.

Больным были выполнены следующие оперативные вмешательства: субтотальная резекция желудка — 1, гастрэктомия — 2, расширенная гастрэктомия — 2, комбинированная гастрэктомия с резекцией поджелудочной железы и брыжейки поперечной ободочной кишки — 2.

MPMA готовили по следующей методике. Из фрагмента опухоли (размером 2 x 2 см²) готовили клеточную взвесь в среде 199 путем мягкого продавливания через сито специального фторопластового гомогенизатора с диаметром пор не более 1 мм. Взвесь фильтровали, 2–3 раза отмывали в среде 199 центрифугированием при 2500 g, затем замораживали в чашках Петри до –30 °С и подвергали вакуумной сублимационной сушке в камере лиофилизатора УЗВ10.00.00.00 (Украина) на протяжении 10–12 ч. В конце процесса лиофилизации температура клеток не превышала +(4–5) °С. Лиофилизированные клетки помещали в специальную камеру микровибромельницы MMVE-0,005 («Гефест», Россия) и проводили их механохимическую обработку на протяжении 5 мин с интенсивностью подвода механической энергии 20 Вт/г. Полученный материал помещали в стерильные стеклянные флаконы, герметично закрывали и подвергали гамма-облучению в дозе 50 кГр на установке МРХ-гамма-25М (Россия). Выбор дозы облучения был обусловлен необходимостью одновременной стерилизации препарата. Непосредственно перед использованием мРМА к 2 мг сухой массы вещества добавляли 2 мл 0,9% раствора натрия хлорида, ресуспендировали до получения однородной суспензии и вводили больному подкожно в нижний угол левой лопатки на 14-е, 28-е сутки и через 90 сут после операции.

До и после операции, а также после ИТ в периферической крови определяли абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов, абсолютное и относительное содержание субпопуляций Т- и В-лимфоцитов. Иммунологические исследования проведены с помощью метода проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan («Becton Dickinson», США) с использованием моноклональных антител («Becton Dickinson», США) при выполнении стандартной процедуры наложения лейкогейта в Simulset Software («Becton Dickinson», США). Оценка иммунного статуса включала определение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов: общей популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов/индукторов (CD4⁺), Т-супрессоров/цитотоксинов (CD8⁺), В-лимфоцитов (CD19⁺), естественных киллеров (CD16⁺/56⁺), иммунорегуляторного соотношения (CD4⁺/CD8⁺). Контролем служила группа из 11 больных РЖ, которым выполняли только хирургическое вмешательство. Иммунологические исследования у лиц контрольной группы проводили до и через 6 мес после операции при отсутствии отдаленных метастазов и рецидивов. В качестве нормы были использованы показатели, полученные при обследовании 13 практически здоровых пациентов.

Клиническое наблюдение за больными, оценку непосредственных, ближайших и отдаленных результатов в течение 12 мес проводили согласно критериям ВОЗ и МПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка непосредственных результатов применения МРМА показала полное отсутствие развития местных и системных аллергических реакций, а также других побочных эффектов. Все больные перенесли ИТ удовлетворительно. Общее количество лейкоцитов во все сроки обследования изменялось незначительно и статистически не отличалось от такового у практически здоровых лиц (табл. 1). При этом как до, так и после операции и применения МРМА количество лимфоцитов было уменьшенным. Во все периоды обследования наблюдали снижение абсолютного содержания CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺-лимфоцитов, тогда как количество естественных киллеров (CD16⁺/56⁺) существенно не отличалось от показателей у практически здоровых лиц.

Значительных изменений количества лимфоцитов, CD3⁺, CD19⁺ и CD4⁺-клеток в динамике лечения не зарегистрировано. Однако после применения мРМА (через 1, 2 и 3 мес после операции) количество CD8⁺-клеток увеличивалось в среднем на 15% (p < 0,05).

Анализ результатов исследования относительного содержания субпопуляций лимфоцитов (табл. 2) показал, что уменьшение абсолютного количества CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺-клеток во все сроки исследования было связано с лимфопенией, а не с истинным дефицитом этих клеток, так как существенных изменений их относительного количества по сравнению с аналогичными показателями у практически здоровых лиц не наблюдалось. Не обнаружено значимых отклонений и содержания естественных киллеров. В то же время до проведения хирургического лечения и через 2 нед после операции относительное количество CD8⁺-лимфоцитов было уменьшено в среднем на 28% (p < 0,05). Через 1, 2 и 3 мес после операции в динамике ИТ содержание CD8⁺-лимфоцитов повышалось до уровня нормы. Соотношение CD4⁺/CD8⁺ до и через 2 нед после операции было существенно повышено за счет низкого содержания CD8⁺, которое через 1, 2 и 3 мес нормализовалось.

По данным иммунологического исследования у лиц контрольной группы, которым было проведено только хирургическое лечение, через 6 мес после операции относительное количество CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-лимфоцитов было уменьшено, а соотношение CD4⁺/CD8⁺ — существенно повышено по сравнению с практически здоровыми лицами. В этот же период у больных основной группы относительное количество CD8⁺-лимфоцитов и соотношение CD4⁺/CD8⁺ не отличались от таковых у здоровых людей (табл. 3). Полученные результаты дают основание полагать, что проведение больным РЖ послеоперационной ИТ с применением МРМА, видимо, оказывает положительное влияние на формирование противоопухолевых клеточных иммунных реакций, поскольку

Таблица 1

Изменения ряда иммунологических показателей у больных РЖ (абсолютное количество)

Срок наблюдения	Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	Лимфоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	CD3 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$	CD19 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$	CD4 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$	CD8 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$	CD16 ⁺ /56 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$
До операции	6,02 ± 0,39	1,52 ± 0,09 [#]	1,03 ± 0,11 [#]	0,17 ± 0,02 [#]	0,63 ± 0,09	0,38 ± 0,03 [#]	0,24 ± 0,04
2 нед после операции	6,39 ± 0,32	1,58 ± 0,09 [#]	1,00 ± 0,11 [#]	0,19 ± 0,01 [#]	0,64 ± 0,09	0,38 ± 0,03 [#]	0,26 ± 0,01
1 мес после операции	6,22 ± 0,29	1,61 ± 0,03 [#]	1,00 ± 0,03 [#]	0,17 ± 0,01 [#]	0,60 ± 0,04 [#]	0,44 ± 0,01 ^{**}	0,26 ± 0,02
2 мес после операции	5,58 ± 0,13	1,51 ± 0,08 [#]	1,02 ± 0,07 [#]	0,14 ± 0,01 [#]	0,56 ± 0,06 [#]	0,42 ± 0,03 [#]	0,22 ± 0,01
3 мес после операции	5,42 ± 0,14	1,49 ± 0,05 [#]	1,04 ± 0,05 [#]	0,16 ± 0,01 [#]	0,57 ± 0,04 [#]	0,44 ± 0,02 ^{**}	0,20 ± 0,02
Практически здоровые лица	5,95 ± 0,61	2,13 ± 0,07	1,37 ± 0,05	0,29 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,29 ± 0,02

p < 0,05 по сравнению с группой практически здоровых лиц;

* p < 0,05 по сравнению с состоянием до операции.

Таблица 2

Изменения относительного содержания субпопуляций лимфоцитов у больных РЖ

Срок наблюдения	CD3 ⁺ , %	CD19 ⁺ , %	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ /56 ⁺ , %
До операции	69,0 ± 3,2	11,0 ± 1,3	40,2 ± 4,2	24,0 ± 1,5 [#]	1,7 ± 0,05 [#]	16,6 ± 2,9
2 нед после операции	65,5 ± 2,0	12,7 ± 1,0	38,9 ± 2,8	24,2 ± 1,1 [#]	1,7 ± 0,1 [#]	17,2 ± 1,2
1 мес после операции	67,2 ± 1,7	11,0 ± 0,5	38,7 ± 2,4	28,7 ± 2,6	1,4 ± 0,09 [*]	17,0 ± 1,6
2 мес после операции	69,0 ± 1,4	9,5 ± 0,7	38,0 ± 2,4	29,2 ± 1,0 [#]	1,2 ± 0,07 [*]	15,3 ± 1,2
3 мес после операции	69,2 ± 1,4	10,5 ± 0,5	37,8 ± 2,2	29,2 ± 1,1 [#]	1,3 ± 0,08 [*]	14,7 ± 1,4
Практически здоровые лица	71,3 ± 4,9	13,5 ± 3,3	41,8 ± 4,1	33,4 ± 4,5	1,3 ± 0,07	13,9 ± 2,3

p < 0,05 по сравнению с группой практически здоровых лиц;

* p < 0,05 по сравнению с состоянием до операции.

Таблица 3

Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов у больных РЖ через 6 мес после операции в зависимости от способа лечения

Способ лечения	CD3 ⁺ , %	CD19 ⁺ , %	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD16 ⁺ /56 ⁺ , %
Радикальная операция (контрольная группа)	57,8 ± 3,5 [#]	15,4 ± 4,9	34,6 ± 1,5 [#]	19,3 ± 5,7 [#]	1,8 ± 0,08 [#]	14,5 ± 4,8
Радикальная операция + ИТ	65,8 ± 2,2	10,8 ± 0,7	36,8 ± 1,9	28,4 ± 0,8 [*]	1,3 ± 0,06 [*]	17,0 ± 1,6
Практически здоровые лица	71,3 ± 4,9	13,5 ± 3,3	41,8 ± 4,1	33,4 ± 4,5	1,3 ± 0,07	13,9 ± 2,3

p < 0,05 по сравнению с группой практически здоровых лиц;

* p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

CD8⁺-лимфоциты являются клетками, которые выполняют прежде всего цитотоксическую функцию.

В исследованиях других авторов, проведенных с применением аналогичных методов, у больных РЖ III–IV стадии установлен несколько иной характер изменений: уменьшение абсолютного количества лимфоцитов, CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺-лимфоцитов при неизменном количестве CD8⁺-клеток и естественных киллеров CD16⁺/56⁺ [10]. Соотношение CD4⁺/CD8⁺ было снижено, уровень снижения коррелировал со степенью опухолевой инвазии, количеством метастазов в лимфатических узлах и размерами опухоли [11]. Однако в ранее опубликованных сообщениях есть данные о наличии CD8⁺-лимфоцитопении у больных с распространенным РЖ [12, 13]. В исследованиях, посвященных изучению лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, установлена доминирующая роль CD8⁺-клеток в противоопухолевой защите при солидных опухолях желудка [13].

Наблюдаемое нами увеличение количества CD8⁺-лимфоцитов в периферической крови у больных РЖ при проведении ИТ с помощью МРМА может быть обусловлено эффектом активации свободнорадикальных и адгезивных свойств поляризованных микрочастиц вводимых в организм аутологических опухолевых клеток, что повышает их средство к макрофагам. В дальнейшем в результате межклеточных и внутриклеточных взаимодействий (МРМА-макрофаг — Т-хелпер — интерлейкин — цитотоксический Т-лимфоцит) возможна инициация механохемиэмисионной передачи сигналов от мембранных рецепторов к ядру [14], что может активировать клон CD8⁺-клеток.

В течение 1 года наблюдения все больные РЖ, которым проводили ИТ с применением МРМА,

живы, признаки метастазирования не отмечены. Годичная выживаемость больных контрольной группы (после только хирургического лечения) составила 67 ± 4%. К исходу первого года после операции 33% больных умерли вследствие метастазов и рецидивов. Окончательные выводы об эффективности ИТ МРМА можно сделать после изучения отдаленных результатов — 3- и 5-летней выживаемости большего количества больных, участвующих в исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

- Моисеенко ВМ, Бадлуев ИА, Хансон КП. Вакцинотерапия злокачественных опухолей. Вопр онкол 1999; 45: 327–32.
- Эдельман ДМ. Топобиология. В мире науки 1989; 7: 24–33.
- Хайнике Г. Трибохимия. Москва: Мир, 1987. 584 с.
- Орел ВЭ, Гриневич ЮА, Данко МИ и др. Влияние механохимически модифицированных сингенных опухолевых клеток на рост и процессы метастазирования карциномы Льюиса и меланомы В16. Доп Нац АН України 1998; 10: 183–8.
- Козлов АМ, Иванов ПК, Вайсон АА и др. Противоопухолевая вакцина на основе аутологических опухолевых клеток человека модифицированным геном tag7. В: Онкология 2000, тезисы II съезда онкологов стран СНГ. Киев 2000. Exp Oncol; 22 (Suppl): 234.
- Барабой ВА, Орел ВЭ, Карнаух ИМ. Перекисное окисление и радиация. Киев: Наук думка, 1991. 256 с.
- Гриневич ЮА, Каменец ЛЯ. Основы клинической иммунологии опухолей. Киев: Здоров'я, 1986. 160 с.
- Шляховенко ВА. Современные подходы к созданию противоопухолевых вакцин. Эксперим онкол 2000; 22: 99–109.
- Ройт А. Основы иммунологии. Москва: Мир, 1991. 328 с.
- Katoh Y, Ishida M, Hiraishi H, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with gastric cancer. Dokkyo J Med Sci 1993; 20: 129–37.
- Lee WJ, Chang KJ, Lee ChSh, et al. Selective depression of T-lymphocyte subsets in gastric cancer patients: An implication of immunotherapy. J Surg Oncol 1994; 55: 165–9.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

12. **Tanabe H, Imai N, Watanabe S, et al.** Изучение двухцветной цитометрией субпопуляций лимфоцитов у больных раком желудка. *Jap Cancer Clin* 1991; **37**: 821–4.

13. **Soria J, Morandeira MJ, Ortago J, et al.** T-cell subsets in malignant tumors. *Pathol Res Pract* 1989; **185**: 151–2.

14. **Орел В.Э.** Биологическая механоэмиссия в процессах межклеточных и внутриклеточных взаимодействий. *Актуал пробл биол и мед* 2000; **1**: 372–81.

USE OF MODIFIED AUTOLOGOUS TUMOR CELLS FOR POSTOPERATIVE IMMUNOTHERAPY IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

*V.L. Valetsky, V.E. Orel, Yu.A. Grinevich,
V.A. Cherny, M.I. Danko, N.N. Dzyatkovskaya*

Summary. *Post-surgery immunotherapy of patients with gastric cancer was applied in combination with autovaccines*

modified using mechanochemical/radiation techniques. Six months after immunotherapy patients showed normalization of the sub-populations of peripheral blood lymphocytes, in particular, increased numbers of CD8⁺ cells and CD4⁺/CD8⁺ ratios. One-year survival rate of patients subjected to immunotherapy was 33% higher relative to the control group (patients subjected to surgery alone).

Key Words: gastric cancer, post-surgery immunotherapy, immunogram, one-year survival.

Адрес для переписки:

Орел В.Э.
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Институт онкологии АМН Украины,
физико-техническая лаборатория