

НОВЫЙ СПОСОБ ХИМИОИММУНОПРОФИЛАКТИКИ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

© 2009 Ю.С. Сидоренко, Г.З. Сергостьянц, Е.М. Франциянц, Е.Ю. Златник,
К.С. Саркисянц

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт

Поступила в редакцию 21.11.2009

Целью настоящего исследования явилось улучшение результатов лечения больных операбельными стадиями немелкоклеточного рака легкого путем применения нового способа периоперационной химиоиммунопрофилактики метастазирования, которая заключается в периоперационной санации сосудистого русла организма больных химиопрепаратами с одномоментной иммунокоррекцией. Применение предлагаемого нами метода обеспечивает благоприятную иммунологическую динамику, которая является основой улучшения непосредственных результатов лечения больных. Периоперационная химиоиммунопрофилактика является оправданным и целесообразным способом повышения одногодичной выживаемости, которая обеспечивается коррекцией иммунного статуса и химиосанацией организма больных.

Ключевые слова: *рак легкого, химиоиммунопрофилактика, иммунитет*

Наличие иммунодефицитного состояния, преимущественно связанного с депрессией Т- и NK-клеточного звеньев у онкологических больных, неоднократно описано в литературе (Олейник Е.К. и соавт., 2001; Аутеншлюс А.И. и соавт., 2002; Nakamura H. et al., 2000). Во многих работах показаны механизмы развития иммунной депрессии, а именно цитокиновый дисбаланс, в частности, снижение продукции IL-2 (Fischer J.R. et al., 2000), нарушение рецепции цитокинов лимфоцитами (Matsumoto M. et al., 2001), повышение продукции ангиогенных и иммунодепрессивных факторов (White E.S. et al., 2001; Woo E.Y. et al., 2001). К другим механизмам относится угнетение дифференцировки антигенпрезентирующих дендритных клеток (Almand B. et al., 2000; Katsenelson N.S. et al., 2001), подавление активности естественных киллеров и нейтрофилов (Кулаков В.В. и соавт., 1999). С учетом этого обеспечение предотвращения дальнейшей иммунодепрессии при проведении оперативных вмешательств по поводу рака легкого играет важную роль, тем более что при операции создается реальная опасность диссеминации опухолевых клеток (Kurusu Y. et al., 1996). По этой же причине при осуществлении гемотрансфузий, являющихся неотъемлемым компонентом интра- и после

операционного лечения таких больных, следует отдавать предпочтение переливанию аутологичной крови, так как введение донорской может вызвать иммунодепрессию (Hallfeldt K. et al., 1995).

Целью настоящего исследования явилось улучшение результатов лечения больных операбельными стадиями немелкоклеточного рака легкого путем применения нового способа периоперационной химиоиммунопрофилактики метастазирования.

Материалы и методы. В исследование были включены 42 больных раком легкого T₁₋₃N₁₋₂M₀. Всем больным первым этапом комплексного лечения была выполнена пневмонэктомия. 20 больным контрольной группы после завершения оперативного пособия проводили трансфузию одноклассной донорской крови в объеме 200 мл однократно. Химиопрепараты: цисплатин – 50 мг/м², доксорубицин – 50 мг/м², циклофосфан – 600 мг/м² больным этой группы вводили традиционно через 1 неделю после операции. Больным основной группы (22 человек) во время операции после перевязки сосудов корня легкого из легочной артерии осуществляется забор крови в количестве 400-600 мл в емкость, содержащую глюгицир в качестве антикоагулянта. Затем кровь сепарируют на 3 фракции, отбирают клеточную массу, туда добавляют химиопрепараты: доксорубицин – 50 мг/м², циклофосфан – 600 мг/м² инкубируют смесь при 37⁰С в течение 30 мин и внутривенно капельно вводят больному во время продолжающегося оперативного вмешательства. Тромболейкомассу объемом 20,0 мл инкубируют с 300 тыс. МЕ реаферона в течение 3 часов, разводят добавлением 100,0 мл физиологического раствора и в ближайшем послеоперационном периоде

Сидоренко Юрий Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН и РАМН, директор

Сергостьянц Геннадий Завенович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением торакальной пластической хирургии

Франциянц Елена Михайловна, доктор биологических наук, профессор, руководитель гормональной лаборатории

Златник Елена Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории иммунологии и бактериологии

Саркисянц Кристина Сергеевна, аспирант

реинфузируют больному внутривенно, капельно. Плазму крови замораживают при температуре -40°C , затем на 7-е сутки послеоперационного периода ее размораживают, инкубируют с цисплатином в дозе 50 мг/м^2 и вводят больному внутривенно, капельно с гипергидратацией.

Для оценки состояния Т- и В-лимфоцитов проводили их выделение из периферической крови по А. Воуи (1968) в градиенте фикол-верографина (плотность 1,077–1,078) с последующим трехкратным осаждением средой 199. Жизнеспособность лимфоцитов оценивали по проценту неокрашенных клеток после добавления к взвеси 0,2% раствора трипанового синего. Количество погибших клеток не превышало 2-3%. Состояние Т-клеток изучали в ряде количественных и функциональных тестов. Общее содержание Т-лимфоцитов в крови и лимфе определяли в реакции спонтанного розеткообразования (РСРО) с эритроцитами барана (Jondal M. et al., 1972), отдельно подсчитывали процент лимфоцитов, образующих «активные» (многорецепторные) розетки. Субпопуляционный состав оценивали иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител против рецепторов CD4+ и CD8+ (Хайтов Р.М. и соавт., 1995; Фримель Х., 1987). Учет проводили с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ И-3 путем подсчета процента клеток с мембранной флюоресценцией. Рассчитывали иммунорегуляторный индекс (ИРИ) по формуле

$$\text{ИРИ} = \frac{\text{CD4} +}{\text{CD8} +}$$

Для постановки иммунофлюоресцентного теста использовали антитела фирмы «Сорбент» (Москва). Функциональную активность Т-лимфоцитов оценивали в реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) после 48-72-часового культивирования при 37°C в присутствии 5% CO_2 в полной культуральной среде (Новиков Д.К., Новикова В.И., 1979). Параллельно оценивали спонтанную бласттрансформацию, для чего вместо митогена в пробу добавляли равный объем культуральной среды.

Фагоцитарную активность, фагоцитарное число и интенсивность кислородозависимых реакций «дыхательного взрыва» оценивали в нейтрофилах с помощью спонтанного и стимулированного зимозаном теста восстановления нитросинего тетразолия до диформаза (НСТ-теста) с вычислением коэффициента НСТстим./НСТспонт. (Маянский А.Н.,

Маянский Д.Н., 1983). Состояние В-клеточного звена иммунной системы определяли по содержанию В-лимфоцитов в крови в РСРО с эритроцитами мыши. Функциональную активность В-клеток изучали в РБТЛ с ЛПС. Уровень иммуноглобулинов основных классов (IgG, IgA, IgM) изучали в реакции радиальной иммунодиффузии по Mancini G. (1965).

Состояние НК-клеточного звена оценивали по содержанию в крови больших гранулярных лимфоцитов – БГЛ (Киндзельский Л.П., Бутенко А.К., 1983), которое подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Паппенгейму. Кроме того, определяли количество лимфоцитов, экспрессирующих CD16+ и CD56+ рецепторы, в непрямом иммунофлюоресцентном тесте. Функциональную активность НК-клеток изучали в цитотоксическом тесте (ЦТТ). В качестве клеток-мишеней использовали культуру клеток эритромиелолойкоза человека K562, полученную из коллекции Института иммунологии РАМН (Москва) (Фримель Х., 1987; Рахмилевич А.Л., Рахимова М.С., 1988).

Результаты исследования. Исходный иммунный статус больных раком легкого характеризовался иммунодефицитным состоянием – статистически значимым снижением всех количественных и функциональных показателей клеточного иммунитета (табл. 1, 2). Динамика иммунологических показателей больных контрольной группы (оперированных с применением трансфузий донорской крови) представлена в табл. 1. Как видно из приведенного материала, у больных этой группы через 14 дней после операции происходило статистически достоверное снижение на 14% по сравнению с исходными данными процентного содержания Т-лимфоцитов, а также основных субпопуляций, ответственных за процессы распознавания, продукцию цитокинов и цитотоксичность. Так? количество CD4+ в процентном и абсолютном отношении снижалось на 34,2% и 49,2% соответственно, количества CD8+ клеток – на 29,8% и 39,7% соответственно. Вместе с тем не отмечено изменения показателя иммунорегуляторного индекса CD4+/CD8+. Снижение абсолютного уровня БГЛ (естественных киллеров) составило 39,1%. Найдено угнетение и В-клеточного иммунитета больных, оперативное лечение которых сопровождалось использованием донорской крови. Так абсолютное содержание В-лимфоцитов снизилось на 39,7%, а функциональная активность при использовании ЛПС снизилась на 27,6%.

Таблица 1. Показатели иммунного статуса у больных раком легкого до и после пневмонэктомии с трансфузией донорской крови

Показатель	До лечения		После лечения	
	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$
Т-лимфоциты	53,5±1,44	0,99±0,18	46,5±1,49*↓	0,67±0,07*↓
CD4+	35,6±5,9	0,65±0,16	23,4±2,06*↓	0,33±0,03*↓
CD8+	33,2±4,0	0,58±0,08	23,3±2,78*↓	0,35±0,04*↓
CD4+/CD8+	1,09±0,14		1,0±0,11	
CD16+	20,0±1,4	0,37±0,07	16,2±2,29	0,24±0,02*↓
В-лимфоциты	18,7±0,85	0,34±0,07	16,2±0,6	0,23±0,02*↓
Спонт.	17,8±0,36	-	18,4±1,9	-
ФГА	32,0±1,19	0,58±0,09	29,1±1,4	0,41±0,04
ИС _{ФГА}	1,79±0,055		1,68±0,2	
КонА	22,4±1,04	0,39±0,05	20,2±0,71	0,29±0,03
ЛПС	32,6±1,22	0,58±0,08	30,0±1,27	0,42±0,003*↓
ИС _{ЛПС}	1,83±0,2		1,75±0,256	
БГЛ	2,6±0,15	0,23±0,02	2,4±0,23	0,14±0,01*↓

Примечание: * – статистически достоверные отличия от исходных показателей ($P < 0,05$); ↓ – снижение показателя.

Иммунологические изменения у больных основной группы, которым выполнялась пневмонэктомия и проводилась аутогемиоиммуноотерапия на компонентах крови из удаляемого легкого, представлены в таблице 2. Найдено, что через 14 дней после окончания лечения у них отмечено статистически достоверное повышение по сравнению с исходным состоянием на 17,2% и 41,8% соответственно процентного и абсолютного содержания Т-лимфоцитов, абсолютного содержания В-клеток – на 80%, в том числе процентного и абсолютного уровня функционально активных клеток (отвечающих на ЛПС в РБТЛ) – на 16,3% и 45,7% соответственно. Повысилось также процентное содержание моноцитов на 54,5% и активности моноцитарно-макрофагального звена, оцениваемой по ПМТМ – на 34,2% (табл. 2). Исчисление иммунологических показателей в абсолютных значениях продемонстрировало, повышение уровня этих клеток в 2,3 раза и 36,4 раза соответственно. При сравнении значений параметров иммунного статуса у больных контрольной и основной групп обнаружены статистически значимые более высокие относительные уровни Т- и В-клеток, ПМТМ, а также процентного и абсолютного содержания CD4+ клеток после использования аутологичной крови.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что применение предлагаемого нами метода обеспечивает благоприятную иммунологическую динамику, которая, вероятно, и явилась основой улучшения основных клинических показателей лечения больных.

При оценке непосредственных результатов применения периоперационной аутогемиоиммуноотерапии (АГХИТ) на компонентах аутоорганной крови выяснилось, что она не оказала существенного влияния на течение наркоза, ближайшего послеоперационного периода. Длительность наркоза, план анестезии, время экстубации достоверно не различались в сравниваемых группах. В послеоперационном периоде у больных основной группы различные осложнения развились у 8 (36,3% ±10,3), в контрольной группе – у 7 (35% ±10,7). Так, послеоперационные внутриплевральные кровотечения у пациентов, подвергнутых только оперативному вмешательству, наблюдались в 2-х случаях (10% ±6,7). Больным выполнена реторакотомия, остановка внутриплеврального кровотечения. Наблюдалось диффузное кровотечение из сосудов париеальной плевры. Один из этих пациентов погиб от развившейся на 5-е сутки тромбоэмболии легочной артерии. В основной группе кровотечение после операции наблюдалось также у 2 пациентов (9% ±6,1). Обоим больным на 1-е сутки после пневмонэктомии выполнено оперативное вмешательство в объеме реторакотомии, остановки внутриплеврального кровотечения. Источник кровотечения не был обнаружен. Проявления дыхательной и сердечной недостаточности у 4 пациентов в основной группе (18% ±8,2) и у 3-х (15% ±8) в контрольной. При изучении осложнений, специфических для цитостатиков, выявились полное отсутствие гематологической токсичности, одинаковая частота и выраженность диспепсических осложнений в основной и контрольной группах (у 5 больных в каждой группе).

Таблица 2. Показатели иммунного статуса у больных раком легкого до и после пневмонэктомии с периоперационной аутогемохимииммунотерапии на компонентах крови из удаляемого легкого

Показатель	До лечения		После лечения	
	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$
Т-лимфоциты	45,8±1,22	0,55±0,06	53,7±3,29*↑	0,78±0,09*↑
CD4+	33,6±2,0	0,41±0,048	32,2±3,3	0,51±0,086
CD8+	28,5±1,94	0,35±0,036	29,2±4,15	0,49±0,1*↑
CD4+/CD8+	1,18±0,03		1,16±0,08	
CD16+	19,0±1,34	0,21±0,02	18,5±1,51	0,268±0,05
В-лимфоциты	17,8±0,67	0,15±0,028	18,6±0,72	0,27±0,03*↑
Спонт.	16,5±1,46	-	17,4±1,48	-
ФГА	30,7±2,36	0,36±0,06	33,9±2,06	0,456±0,066
ИС _{ФГА}	1,87±0,05		1,99±0,16	
Кона	23,5±1,54	0,28±0,055	23,3±2,18	0,33±0,042
ЛПС	29,4±2,0	0,35±0,04	34,2±1,9*↑	0,51±0,07*↑
ИС _{ЛПС}	1,86±0,2		1,95±0,2	
БГЛ	2,85±0,4	-	2,5±0,21	-
Моноциты	5,5±1,33	0,28±0,087	8,5±1,06*↑	0,65±0,11*↑
ПМТМ	33,0±2,66	0,088±0,0195	44,3±3,55*↑	0,32±0,079*↑

Примечание: * – статистически достоверные отличия от исходных показателей ($P < 0,05$); ↑ – повышение показателя.

Полученные результаты, показывают, что периоперационная АГХИТ на компонентах аутоорганной крови не влияет на частоту интра- и послеоперационных осложнений. Вместе с тем при анализе годичной выживаемости больных отмечено, что в контрольной группе умерло 6 (30%±10,2) больных, 14 пациентов живы. Прогрессирование процесса наблюдалось у 8 больных (40%±11). Все 22

пациента основной группы наблюдаются в течение 12 месяцев без признаков метастазирования и рецидивирования.

Выводы: периоперационная химиоиммунопрофилактика обеспечивает коррекцию иммунного статуса, химиосанацию организма больных и является оправданным и целесообразным способом повышения одногодичной выживаемости.

A NEW METHOD OF CHEMOIMMUNOPREVENTION OF LUNG CANCER METASTASES

© 2009 Yu.S. Sidorenko, G.Z. Sergostyantz, E.M. Frantziyantz, E.Yu. Zlatnik, K.S. Sarkisyantz

Rostov Cancer Research Institute

The aim of the present study is to improve treatment results of patients with operable stages of non-small cell lung cancer by applying a new method of perioperative chemoimmunoprevention of metastases that includes perioperative sanitation of vascular channel of organism of patients with chemotherapeutic agents and simultaneous immunocorrection. The method contributed to favourable immunologic dynamics that was a base for improving immediate treatment results. Perioperative chemoimmunoprevention is a justified and expedient way to improve 1-year survival by means of correction of immune status and chemosanation of patients' organism.

Key words: lung cancer, chemoimmunoprevention, immunity

Yuriy Sidorenko, Academician of RAS and RAMS, Doctor of Medicine, Professor, Director
Gennadiy Sergostyantz, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Thoracic Plastic Surgery Department
Elena Frantziyantz, Doctor of Biology, Professor, Chief of the Hormonal Laboratory
Elena Zlatnik, Doctor of Medicine, Professor, Chief of the Immunologic and Bacteriologic Laboratory
Kristina Sarkisyantz, Graduate Student