

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК 2014 № 3

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК 2014 № 3

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 2004 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Гончаров А. Е., Титов Л. П., Кошелев С. В., Путырский Л. А., Дубровский А. Ч., Романова И. В., Кошелева М. И., Шаповал Е. В., Смолякова Р. М., Бесман Е. В. Противорецидивная иммунотерапия рака молочной железы вакциной на основе аутологичных дендритных клеток	4
Белецкий А. В., Шалатонина О. И., Кандыбо И. В., Бондарев О. Н., Ситник А. А. Функциональный контроль эффективности хирургического лечения переломов проксимального отдела большеберцовой кости.....	20
Медведский И. Н. Влияние серосодержащего производного 3,5-ди- <i>трет</i> -бутилпирокатехина на активность Nrf2-зависимых ферментов эритроцитов и гомогенатов печени.....	27
Балыш Е. М., Статкевич Т. В., Патеюк И. В., Картун Л. В., Митьковская Н. П. Рецидивирующие коронарные события у пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда.....	32
Малюк Б. В., Эйсмонт О. Л., Белецкий А. В., Борисов А. В., Пересада А. С. Влияние перфораций субхондральной кости на процессы хондро- и остеорегенерации при рассекающем остеохондрите мыщелков бедра.....	38
Митьковская Н. П., Абельская И. С., Медведев Д. Г., Статкевич Т. В., Балыш Е. М., Григоренко Е. А., Патеюк И. В., Босяков С. М., Пискун Б. Б. Оценка вероятности развития рецидива окклюзии инфаркт-связанной артерии	45
Шанько Ю. Г., Нечипуренко Н. И., Наледько А. Н., Щербина Н. Ю., Комликов С. Ю., Матусевич Л. И. Нейропротективная терапия в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы	52

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

УДК 616:612.017.1

А. Е. ГОНЧАРОВ¹, Л. П. ТИТОВ¹, С. В. КОШЕЛЕВ², Л. А. ПУТЫРСКИЙ², А. Ч. ДУБРОВСКИЙ²,
И. В. РОМАНОВА¹, М. И. КОШЕЛЕВА², Е. В. ШАПОВАЛ², Р. М. СМОЛЯКОВА², Е. В. БЕСМАН¹

ПРОТИВОРЕЦИДИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии,
Минск, Беларусь

(Поступила в редакцию 05.05.2014)

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре заболеваемости и смертности женщин от злокачественных новообразований. Так, за 10 лет (2002–2011 гг.) первичная заболеваемость увеличилась от 57,5 до 76,7 случая на 100 тыс. женского населения Беларуси. В структуре всех злокачественных новообразований частота РМЖ среди женщин Беларуси в 2011 г. составила 17,3 %, в том числе 23,7 % среди женщин трудоспособного возраста. Пятилетняя скорректированная выживаемость среди женщин с I–II стадией болезни составила 80,6 %. В настоящее время ни у кого не вызывает сомнений важность и необходимость применения хирургического, лучевого и химиотерапевтического методов лечения как классической триады в терапии рака. Однако даже у пациентов, терапию которых проводили на ранних стадиях злокачественного процесса, впоследствии часто регистрируются рецидивы заболевания, влияющие на показатели выживаемости и качество жизни [1–3].

Одним из новых подходов к лечению рака является использование клеточных технологий. Так, дендритные клетки (ДК) с успехом использовали в терапии метастатического рака различных локализаций. В частности, была доказана эффективность применения этих клеток в лечении пациентов, страдающих раком простаты, что позволило Управлению по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США в 2010 г. одобрить использование ДК для данной цели [4]. Попытки терапии РМЖ при помощи ДК предпринимаются с конца 1990-х годов [5]. К настоящему времени опубликованы результаты нескольких клинических испытаний метода терапии метастатического РМЖ, а также протоковой карциномы *in situ* [5–12].

Исследования, направленные на улучшение существующих технологий терапии при помощи ДК, в настоящее время продолжают. Так, результаты трех клинических испытаний метода иммунотерапии пациентов, страдающих РМЖ, с использованием ДК, праймированных различными антигенами [13–15], подтвердили актуальность и эффективность применения ДК в комплексном лечении метастатического РМЖ.

В то же время более перспективным, на наш взгляд, является использование ДК на ранних стадиях злокачественного процесса для стимуляции противоопухолевого иммунитета, направленного на конкретные опухолеассоциированные белки. Подобное воздействие приведет, в конечном счете, к элиминации клеток опухоли и предотвращению метастазирования.

Объекты и методы исследований. Объектами исследований служили образцы периферической крови и фрагменты опухоли 44 пациентов с РМЖ, образцы периферической крови 24 здоровых добровольцев и доноров (Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий), культуры ДК.

Методы иммуногистохимии. Определение антигенов Ki-67, p53 и HLA-DR в опухолевой ткани осуществляли методом иммуногистохимии (ИГХ) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя антител (Dako, Дания). Результаты учитывали с использованием светового микроскопа [16]. Параллельно с исследуемыми образцами опухолей ставили положительные и отрицательные контрольные пробы из заведомо известных образцов ранее исследованных опухолей. Опухоль считали положительной по Ki-67, HLA-A2 и p53, если отмечалась ядерная реактивность более чем в 10 % опухолевых клеток, гиперэкспрессией p53 считали специфическую ядерную реактивность более чем в 20 % злокачественных клеток.

Забор материала для исследования. Забор периферической (венозной) крови в количестве 40–50 мл в стерильные полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом производил средний медицинский персонал РНПЦ онкологии и медрадиологии, после чего пробирки течение 1–2 ч с момента забора крови доставляли в лабораторию.

Подготовка культур ДК. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли путем центрифугирования крови на градиенте плотности фиколл-пака с плотностью 1077 г/л. Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии и культивировали в течение 7 сут в бессывороточной питательной среде AIM-V, содержащей рекомбинантные человеческие цитокины (50 нг/мл ГМ-КСФ и 25 нг/мл ИЛ-4), при 37 °С, в увлажненной атмосфере с 5 %-ным CO₂. Затем ДК праймировали 40 мкг/мл пептидов мутантного протеина p53 (p53_{65–73} RMPEAAPPV, p53_{264–272} LLGRNSFEV, p53_{139–147} KLCPVQLWV, p53_{103–111} YLGSYGFRL) на протяжении 6 ч и культивировали 18 ч в среде, содержащей 25 нг/мл ГМ-КСФ, 12,5 нг/мл ИЛ-4, 50 нг/мл фактора некроза опухолей(ФНО)-а и дибутирил-цАМФ (10⁻⁶ М) в качестве индуктора созревания [17]. Перед введением пациенту культуры ДК отмывали однократно в фосфатном буферном растворе Дальбекка (DPBS), затем дважды в большом объеме физиологического раствора, суспендировали в 1–2 мл физиологического раствора и доставляли в течение 1–2 ч в клинику.

Контроль качества. Перед введением пациенту культуры ДК проходили тщательный контроль, включающий несколько этапов: 1) подсчет числа ДК в суспензии; 2) оценку их жизнеспособности с использованием йодида пропидия или 7-аминоактиномицина; 3) оценку морфологии ДК; 5) оценку иммунофенотипа ДК (экспрессия маркеров CD86, CD11c и CD83); 6) контроль микробиологической чистоты.

Определение иммунофенотипа лимфоцитов. Для определения иммунофенотипа лимфоцитов использовали цельную венозную гепаринизированную кровь. Цельную кровь в количестве 50 мкл инкубировали с соответствующими моноклональными антителами, лизировали эритроциты раствором хлорида аммония, осаждали клетки путем центрифугирования, удаляли супернатант и суспендировали клетки в DPBS. Учет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Определение антигенспецифических клеток (АСК). I. Активация. К 500 мкл крови добавляли: 1) форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) (25 нг/мл), иономицин (1 мкг/мл) и монензин (10 мкг/мл), 2) смесь пептидов мутантного p53 (по 40 мкг/мл каждого) и монензин (10 мкг/мл), 3) 100 мкл DPBS и монензин (10 мкг/мл). Объем доводили средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали суспензию 6 ч при температуре 37 °С. *II. Пробоподготовка.* Кровь инкубировали с моноклональными антителами к поверхностным антигенам, эритроциты лизировали раствором хлорида аммония, клетки осаждали путем центрифугирования и фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида, пермеабелизировали в 0,1 %-ном растворе сапонина, после чего инкубировали с моноклональными антителами к внутриклеточным цитокинам.

Методика введения культур ДК и наблюдение за пациентами после первого введения культур клеток. ДК вводили при наличии информированного согласия пациента на терапию в условиях стационара. При первом введении клеток для предотвращения возможных аллергических реакций проводили кожный тест, для чего в область медиальной поверхности предплечья внутрикожно вводили 0,1 мл взвеси клеток. При отсутствии системных и местных реакций через 30 мин подкожно, с соблюдением правил асептики и антисептики, вводили оставшуюся взвесь клеток (по 0,3–0,4 мл в следующие зоны: предплечье, нижний край грудины, над ключицей). После введения культур ДК проводили следующее обследование: клинический осмотр и осмотр места инъекции – ежедневно, общий анализ крови – на 2-е сутки после начала терапии, общий анализ мочи – на 2-е сутки после начала терапии, биохимический анализ крови – на 2-е сутки после начала терапии.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США) и StatPlus 5.5 (AnalystSoft, Канада). Значения показателей представлены преимущественно в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей. В некоторых случаях данные представлены в виде Mean \pm SD, где Mean – среднее значение, SD – стандартное отклонение. Нормальность распределения величин оценивали с помощью *W*-критерия Шапиро–Вилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей применяли непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали *U*-критерий Манна–Уитни, для сравнения связанных выборок – критерий Уилкоксона, для сравнения трех групп независимых данных – метод рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса. В случае, если уровень значимости составлял менее 0,05, проводили парное сравнение данных между группами, используя метод Манна–Уитни. Статистическую значимость различий между качественными характеристиками оценивали при помощи критерия χ^2 . Для определения зависимостей между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмана (R). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $P < 0,05$ [18, 19].

Подбор пациентов и проведение клинических испытаний. Программа клинических испытаний была утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Критериями включения в испытания были: возраст от 18 до 65 лет, наличие РМЖ I–II клинической стадии, наличие в опухоли экспрессии маркерных протеинов Ki-67, мутантного протеина p53, HLA-A2. Для участия в клинических испытаниях было сформировано две группы: в основную группу вошли 23 пациента, которым помимо терапии РМЖ по утвержденным стандартам проводили терапию ДК, в контрольную – 22 пациента с аналогичными маркерными характеристиками опухолей, которым проводили терапию только с использованием стандартных методов. В клинические испытания не включали лиц с тяжелыми острыми и хроническими интеркуррентными заболеваниями, хроническими инфекциями, аутоиммунными заболеваниями в стадии обострения для исключения влияния сопутствующих факторов на иммунный ответ при проведении иммунотерапии, а также для исключения влияния потенциальных негативных эффектов проводимой клеточной терапии. Подробно и на доступном уровне пациенты были ознакомлены с целью и технологией поэтапного иммунологического лечения и с необходимостью дополнительных лабораторно-диагностических процедур. Для каждого пациента был разработан индивидуальный план клеточной иммунотерапии.

Противоопухолевая иммунотерапия включала два курса лечения, состоявших из трех инъекций ДК в течение первого курса и двух инъекций в течение второго. Интервалы между инъекциями составляли 2–3 недели, а между курсами терапии – 3 мес. Отдельно проводился забор крови с целью последующего анализа состояния иммунного ответа на проводимую иммунотерапию. Каждый этап противоопухолевой аутоиммунотерапии выполнялся в течение 8 сут с последующими контрольными исследованиями состояния иммунитета через 21–28 сут и через 2–3 мес. перед следующим этапом иммунотерапии. Полностью завершили все этапы клинических испытаний 22 пациента в возрасте от 27 до 58 лет (табл. 1). Из основной группы исключен пациент 11Д, так как повторные исследования ИГХ-статуса показали низкий уровень экспрессии мутантного p53 (0–3 %), что не соответствует критериям включения в испытания.

Т а б л и ц а 1. Результаты лабораторного обследования пациентов в процессе проведения иммунотерапии

Показатель	До начала иммунотерапии	На 2-е сутки после начала иммунотерапии	Через 2 недели после третьего введения ДК	Через 1 мес после второго этапа иммунотерапии	Норма
Показатели общего анализа крови					
Эритроциты, $\times 10^9$ /мл	4,4 \pm 0,11	4,4 \pm 0,18	4,4 \pm 0,30	4,4 \pm 0,23	3,7–5,1
Гемоглобин, г/л	127,3 \pm 2,4	120,8 \pm 4,4	132,1 \pm 7,1	132,9 \pm 5,4	116–164
Тромбоциты, $\times 10^6$ /мл	240,3 \pm 4,7	229,7 \pm 6,4	226,0 \pm 7,1	222,8 \pm 10,1	160–400
Лейкоциты, $\times 10^6$ /мл	6,0 \pm 0,71	6,1 \pm 0,90	6,3 \pm 0,44	6,2 \pm 0,90	4,0–8,8

Показатель	До начала иммунотерапии	На 2-е сутки после начала иммунотерапии	Через 2 недели после третьего введения ДК	Через 1 мес после второго этапа иммунотерапии	Норма
Эозинофилы, %	2,3 ± 0,11	2,4 ± 0,09	2,4 ± 0,31	2,2 ± 0,30	0–5
Нейтрофилы пал., %	–	–	–	–	1–6
Нейтрофилы сегм., %	67,6 ± 0,5	63,7 ± 0,8	64,7 ± 1,1	60,5 ± 1,4	45–70
Лимфоциты, %	24,2 ± 0,3	38,2 ± 1,4	27,8 ± 0,4	28,0 ± 0,3	18–40
СОЭ, мм/ч	7,7 ± 0,09	7,5 ± 0,01	6,3 ± 0,07	6,9 ± 0,04	1–15
Показатели биохимического анализа крови					
Мочевина, ммоль/л	4,5 ± 0,21	4,3 ± 0,60	4,4 ± 0,23	4,3 ± 0,20	1,6–8,3
Креатинин, мкмоль/л	76,9 ± 0,9	71,2 ± 0,6	74,7 ± 1,1	75,0 ± 0,8	44–110
Билирубин, мкмоль/л	10,3 ± 0,07	11,1 ± 0,09	9,8 ± 0,09	10,8 ± 0,14	3,5–20,5
АСТ, ЕД/л	45,8 ± 0,9	45,4 ± 1,3	45,8 ± 1,2	44,8 ± 0,8	5–40
АЛТ, ЕД/л	39,6 ± 1,7	37,6 ± 1,8	39,5 ± 1,9	39,3 ± 2,1	5–40
Показатели общего анализа мочи					
Белок	–	–	–	–	Следы
Кетоны	–	–	–	–	Отсутствуют
Цилиндры	–	–	–	–	Отсутствуют
Лейкоциты, кл.	2,1 ± 0,01	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	2,0 ± 0,01	1–4
Эритроциты, кл.	–	–	–	–	0–2

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования у 12 пациентов, отобранных для предполагаемой иммунотерапии, и у 4 пациентов, участвующих в клинических испытаниях, обнаружено значительное снижение клеточных элементов моноцитарной фракции периферической крови через 3–6 мес. после окончания адъювантной химиотерапии. Потребовалось проведение стимуляции лейкопоза для выделения достаточного количества моноцитов как предшественников ДК. Учитывая результаты этих исследований, для получения достаточного количества моноцитов из периферической крови пациентов с целью культивирования ДК в начале каждого этапа иммунотерапии проводилась стимуляция лейкопоза препаратом лейкостим (300 мг подкожно) за сутки до забора крови, независимо от времени окончания химиотерапевтического лечения.

В связи с невозможностью явиться на повторное обследование в 2013 г., включая исследование иммунного статуса, из контрольной группы исключены пациенты К5Т и К9Д.

Характеристика культур ДК, подготовленных для проведения иммунотерапии. За период выполнения задания подготовлено и использовано для проведения иммунотерапии 23 пациентам 116 культур ДК.

Медианное количество ДК, введенных пациентам за 5 раз, составило $5,0 (3,3–7,0) \cdot 10^6$. Среднее значение оказалось несколько выше – $(5,45 \pm 3,16) \cdot 10^6$. Медианное количество ДК, введенных 23 пациентам, составило $27,6 (22,5–32,3) \cdot 10^6$. Как видно, количество ДК варьировалось в широких пределах. Наименьшее количество клеток было введено пациентам 3К и 7Г. В связи с низким количеством введенных ДК, пациенту 3К было назначено дополнительное (6-е) введение клеток.

Во всех исследованных культурах отсутствовали признаки микробной контаминации. Жизнеспособность клеток составляла более 95 %. ДК во всех исследованных пробах были морфологически однородны, характеризовались звездчатыми клеточными формами с наличием типичных цитоплазматических отростков. В культуре ДК, как правило, присутствовала примесь лимфоцитов, составлявшая не более 25 %, а также фиброциты (продолговатые веретенообразные клетки) в количестве не более 10 % от числа ДК. С целью контроля иммунофенотипа ДК, полученных от пациентов с РМЖ, исследовали экспрессию CD11c, CD83 и CD86. Культуру ДК считали прошедшей иммунофенотипический контроль при наличии относительного числа ДК, экспрессирующих молекулы CD11c (более 90 %), CD86 (более 90 %) и CD83 (более 50 %). В целом ДК характеризовались значительной плотностью экспрессии всех исследованных молекул, что подтверждается высокими показателями интенсивности их флуоресценции и возможностью разделения «позитивных» и «негативных» популяций клеток. Более 98 % проанализированных клеток в культурах ДК пациентов с РМЖ экспрессировали моле-

кату CD11c, что подтверждает их миелоидное происхождение. Используемая в качестве индуктора созревания комбинация ФНО-а и дб-цАМФ индуцировала созревание 87,0 (76,8–94,9) % ДК у пациентов с РМЖ.

Мониторинг клинико-лабораторных параметров, характеризующих состояние пациентов в процессе иммунотерапии ДК. Оценку безопасности и степени переносимости примененного способа иммунотерапии проводили на основании обследования пациентов и изучения лабораторных показателей до начала терапии, в период ее проведения и после ее окончания.

Переносимость способа иммунотерапии оценивали как хорошую, если постинъекционные реакции или побочные явления отсутствовали; как удовлетворительную, если присутствовали лишь постинъекционные реакции; как неудовлетворительную, если у пациентов возникали умеренные побочные явления, связанные с применением способа иммунотерапии. К умеренным побочным явлениям относили такие, которые требовали оказания медицинской помощи и/или отмены иммунотерапии. К постинъекционным реакциям относили реакции, не оказывавшие существенного влияния на состояние здоровья пациента и не требовавшие оказания медицинской помощи (зуд невысокой степени выраженности в месте инъекции, наличие изменений, исчезающих без остаточных изменений на коже и в подкожной клетчатке в течение 2–3 недель после инъекций и не требующих медицинского вмешательства, субфебрильную температуру не более суток после инъекции).

Состояние всех пациентов после проведения иммунотерапии оценивалось как удовлетворительное. Частота сердечных сокращений, уровень артериального давления сохранялись в пределах возрастной нормы. Аритмии не выявлено. Жалобы на одышку, затрудненное дыхание отсутствовали. Катаральные симптомы, миалгия, увеличение и/или болезненность лимфоузлов не зарегистрированы. В целом дискомфорт, связанный с введением аутовакцины, не ощущался. Температура тела после введения аутовакцины у 4 из 22 пациентов повышалась до 37 °С через несколько часов после инъекции, однако в течение последующих 10 ч возвращалась к норме без дополнительной терапии. Гиперемии, отеков, образования инфильтратов или сыпи в месте введения аутовакцины не выявлено. У 8 (40 %) из 22 пациентов отмечался кожный зуд низкой и средней интенсивности в зоне введения ДК продолжительностью от 1 ч до 2 сут после инъекции, что допускалось программой клинических испытаний и не требовало применения лекарственной терапии. У 5 из 22 пациентов через сутки после инъекции отмечалась болезненность слабой интенсивности в здоровой молочной железе, не создававшая существенного дискомфорта и не требовавшая оказания медицинской помощи. К последующему курсу аутоиммунотерапии место предыдущего введения вакцины, а также регионарные лимфоузлы при пальпации не определялись.

Учитывая механизм действия данного метода иммунотерапии, серьезные побочные эффекты введения ДК маловероятны. Несмотря на это, проводили тщательный контроль показателей общего анализа крови, мочи и биохимического анализа крови для исключения гепато-, нефро- и гематотоксического действия аутовакцин. Как показал контроль, число эритроцитов и уровень гемоглобина крови оставались в пределах средних значений физиологической нормы на протяжении всего иммунологического лечения, случаи анемии не зарегистрированы (табл. 2). Тромбоцитопении в ходе исследования не выявлено. В лейкоцитарной формуле также не зафиксировано изменений, сопутствующих воспалительным или аллергическим заболеваниям. Изучение показателей биохимического анализа крови не выявило транзиторного повышения уровня трансаминаз и билирубина, характеризующих функциональное состояние печени, что указывает на отсутствие токсического действия аутовакцин. Результаты общего анализа мочи, указывающие на отсутствие протеинурии и кетонурии, в сопоставлении с результатами биохимического анализа крови не выявили негативного влияния вакцинации на функциональную активность почек. Таким образом, анализ клинических наблюдений за пациентами в совокупности с результатами динамического лабораторного обследования указывает на безопасность и удовлетворительную переносимость использования аутологичных ДК у пациентов с ранним агрессивным РМЖ.

Мониторинг иммунного статуса пациентов в процессе иммунотерапии ДК. С целью контроля безопасности и эффективности проводимой терапии ДК исследовали показатели иммун-

Т а б л и ц а 2. Краткая характеристика пациентов основной группы

Пациент	Год рожд	Диагноз	Хирургическое лечение	Химио- терапия	Лучевая терапия	Гормоно- терапия	ИГХ-статус			
							p53	Ki-67	HLA-A2	Her2/neu
1Л	1965	Рак правой молочной железы, узловатая форма, нижнелатеральный квадрант $pT_{1c}N_0M_0G_2$	Радикальная резекция правой молочной железы	+	+	+	35	65	40	0
2С	1969	Рак левой молочной железы, узловатая форма, верхнелатеральный квадрант $pT_{1c}N_{1a}M_0G_2$	Радикальная резекция левой молочной железы, овариэктомия	+	+	+	96	94	50	+
3К	1977	Рак правой молочной железы, узловатая форма, верхнемедиальный квадрант, мультифокальный рост $pT_{1c}N_0M_0G_2$	Радикальная резекция правой молочной железы	+	+		35	65	40	++
4Р	1970	Рак правой молочной железы, узловатая форма, верхнемедиальный квадрант, мультифокальный рост $pT_{1c}N_0M_0G_2$	Радикальная резекция правой молочной железы	+	+		35	65	40	+
5Н	1959	Рак левой молочной железы, узловатая форма, центральная зона $pT_2N_{1a}M_0G_2$	Мастэктомия слева	+	+	+	45	25	15	+++
6Д	1961	Рак левой молочной железы, узловатая форма, центральная зона $pT_2N_0M_0G_3$	Мастэктомия слева	+			95	9	30	+
7Г	1977	Рак правой молочной железы, узловатая форма, верхнелатеральный квадрант $pT_2N_{1a}M_0G_2$	Радикальная резекция правой молочной железы	+	+		15	18	10	0
8Д	1954	Рак правой молочной железы, узловатая форма, нижнелатеральный квадрант $pT_2N_0M_0G_3$	Мастэктомия слева	+			68	58	18	0
9Х	1961	Рак правой молочной железы, узловатая форма, нижнелатеральный квадрант $pT_2N_0M_0G_2$	Мастэктомия справа	+			22	46	15	0
10Б	1975	Рак правой молочной железы, узловатая форма, верхнелатеральный квадрант $pT_2N_{2a}M_0G_{2-3}$	Радикальная резекция правой молочной железы	+	+		70	31	15	+
12Б	1956	Рак правой молочной железы, узловатая форма, верхнелатеральный квадрант $pT_2N_0M_0G_1$	Радикальная резекция правой молочной железы		+		19	1	60	0
13В	1966	Рак левой молочной железы, узловатая форма, центральная зона $pT_2N_0M_0G_2$	Мастэктомия слева	+			82	78	40	0
14Е	1976	Инфильтративный протоковый рак grade 3, без метастазов в лимфоузлах I–III уровня $pT_2N_0M_0G_3$	Радикальная резекция левой молочной железы	+	+		15	8	30	0

Пациент	Год рожд	Диагноз	Хирургическое лечение	Химио- терапия	Лучевая терапия	Гормоно- терапия	ИГХ-статус			
							p53	Ki-67	HLA-A2	Her2/neu
15Л	1948	Рак правой молочной железы, узловая форма, нижнелатеральный квадрант $pT_2N_2M_0G_2$	Мастэктомия справа	+	+		6	5	50	++
16Д	1954	Рак правой молочной железы, узловая форма, верхнемедиальный квадрант $pT_2N_0M_0G_2$	Мастэктомия справа	+	+	+	65	15	20	+++
17Б	1954	Рак правой молочной железы, узловая форма, верхнемедиальный квадрант $pT_2N_{0-1}M_0G_2$	Мастэктомия справа	+			70	5	15	+
18К	1954	Рак правой молочной железы, узловая форма, верхнелатеральный квадрант $pT_2N_0M_0G_3$	Радикальная резекция правой молочной железы	+			60	20	10	+++
19С	1964	Рак правой молочной железы, узловая форма, верхнемедиальный квадрант $pT_2N_0M_0G_2$	Мастэктомия справа	+			75	3	10	0
20У	1963	Рак левой молочной железы, узловая форма, верхнелатеральный квадрант $pT_2N_{1a}M_0G_3$	Радикальная резекция левой молочной железы	+	+		25	40	10	+
21Г	1976	Рак левой молочной железы, узловая форма, верхнемедиальный квадрант $pT_2N_0M_0G_3$	Радикальная резекция левой молочной железы	+			95	55	55	0
22Т	1963	Рак правой молочной железы, узловая форма, верхнемедиальный квадрант $pT_2N_0M_0G_2$	Мастэктомия справа	+			98	1	65	+++
23Х	1972	Рак левой молочной железы, узловая форма, верхнемедиальный квадрант $pT_2N_{1a}M_0G_2$	Мастэктомия слева, двусторонняя аднексэктомия	+			70	30	50	0

ного статуса у пациентов с РМЖ основной группы до введения ДК и через несколько месяцев после завершения курса терапии, у пациентов контрольной группы – дважды с интервалом в 1–1,5 года, у здоровых добровольцев – однократно.

Исследовали антигенспецифические Т-лимфоциты и субпопуляции лимфоцитов периферической крови: $CD3^+$ Т-клетки, $CD3^+TCRab^+$, $CD3^+TCRgd^+$, $CD3^+CD4^+$ Т-хелперы, $CD3^+CD8^+$ Т-цитотоксические лимфоциты, $CD4^+CD25^{high}$ Т-регуляторные клетки, $CD3^+HLA-DR^+$ активированные Т-клетки, $CD3^+CD69^+$ активированные Т-клетки, $CD28^+$ Т-клетки, $CD45R0^+$ Т-клетки памяти, $CD3^+CD56^+CD16^+$ ЕК-клетки, $CD19^+$ В-клетки, $CD19^+CD5^+$ В1-клетки, $CD19^+CD27^+CD5^+$ В-клетки памяти.

Относительное содержание Т-лимфоцитов у пациентов основной группы до начала иммунотерапии и у пациентов контрольной группы при первом обследовании не имело значимых отличий от показателя у здоровых добровольцев (табл. 3). У пациентов основной группы до начала иммунотерапии имело место статистически достоверное снижение содержания Т-хелперов и увеличение содержания Т-цитотоксических лимфоцитов ($P < 0,05$). У пациентов контрольной группы содержание Т-хелперов было также достоверно снижено, при этом показатель относительного числа Т-цитотоксических лимфоцитов не имел тенденции к снижению.

Т а б л и ц а 3. Содержание Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с РМЖ и у здоровых добровольцев

Группа	Популяция, %					Популяция, $\times 10^6/\text{мл}$				
	Т-клетки	Т-хелперы	Т-цитотокс	CD3 ⁺ TCRab ⁺	CD3 ⁺ TCRgd ⁺	Т-клетки	Т-хелперы	Т-цитотокс	CD3 ⁺ TCRab ⁺	CD3 ⁺ TCRgd ⁺
Осн. группа (<i>n</i> = 22): до терапии	71,1 (65,9–75,1)	40,7 (34,2–44,43)	32,1 (28,4–35,4)	67,6 (63,5–71,2)	2,9 (2,2–3,9)	1,01 (0,84–1,14)	0,55 (0,45–0,62)	0,45 (0,35–0,57)	0,93 (0,73–1,08)	0,04 (0,03–0,08)
<i>P</i> (со здор. добров.)	0,272	0,009	0,039	0,35	0,163	0,0005	0,00004	0,231	0,0005	0,032
<i>P</i> (с контр. группой)	0,99	0,94	0,53	0,81	0,37	0,032	0,069	0,163	0,042	0,062
после тера- пии	69,3 (64,1–73,2)	39,2 (33,1–43,2)	29,3 (22,6–33,7)	62,4 (58,5–68,9)	2,9 (1,9–3,8)	1,0 (0,85–1,58)	0,66 (0,48–0,86)	0,45 (0,35–0,62)	0,94 (0,73–1,51)	0,04 (0,03–0,07)
<i>P</i> (до/после)	0,465	0,506	0,095	0,077	0,758	0,095	0,013	0,4455	0,140	0,390
Контр. груп- па (<i>n</i> = 22): первое об- след.	71,9 (64,4–76,3)	41,9 (34,2–45,2)	29,0 (25,0–36,5)	66,3 (62,4–71,0)	3,5 (2,3–6,0)	1,15 (0,95–1,36)	0,69 (0,49–0,84)	0,52 (0,46–0,61)	1,08 (0,86–1,33)	0,07 (0,04–0,09)
<i>P</i> (со здор. добровольц.)	0,231	0,0001	0,509	0,239	0,545	0,116	0,010	0,956	0,088	0,276
второе об- след.	66,9 (60,1–69,9)	36,4 (33,5–38,8)	27,9 (23,8–34,2)	62,6 (55,1–65,6)	3,0 (2,3–5,8)	1,09 (0,83–1,37)	0,59 (0,43–0,82)	0,48 (0,40–0,61)	1,01 (0,81–1,30)	0,06 (0,03–0,1)
<i>P</i> (до/после)	0,012	0,054	0,108	0,009	0,020	0,709	0,709	0,390	0,709	0,987
Здор. до- бров. (<i>n</i> = 24)	72,7 (68,4–80,1)	46,3 (42,5–53,8)	27,1 (22,4–33,7)	68,0 (63,6–74,5)	5,4 (2,3–6,9)	1,43 (1,05–1,83)	0,95 (0,73–1,19)	0,52 (0,42–0,70)	1,29 (0,99–1,68)	0,1 (0,04–0,15)

Известно, что CD3⁺ Т-лимфоциты по типу Т-клеточного рецептора разделяют на TCRab⁺ клетки (основную субпопуляцию Т-лимфоцитов) и TCRgd⁺ лимфоциты, связывающие суперантигены без обязательной презентации вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости [20]. В процессе проведения иммунотерапии не зарегистрировано значимого изменения содержания Т-клеток, включая Т-клетки с разным типом Т-клеточного рецептора, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток у пациентов основной группы (табл. 3). В то же время у пациентов контрольной группы при повторном обследовании выявлено достоверное снижение содержания Т-клеток с обоими типами клеточного рецептора. Также имеется тенденция к снижению содержания Т-хелперов ($P = 0,054$) при отсутствии изменений со стороны Т-цитотоксических клеток.

Анализ абсолютного содержания Т-лимфоцитов у пациентов основной группы показал достоверное общегрупповое снижение всех представленных в табл. 3 субпопуляций клеток, за исключением Т-цитотоксических. Абсолютное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов контрольной группы достоверно не отличалось от показателей здоровых добровольцев, за исключением сниженного числа Т-хелперов ($P = 0,01$). В то же время содержание TCRab⁺ Т-клеток в контрольной группе было выше, чем в основной ($P = 0,042$). После проведения иммунотерапии у пациентов основной группы зарегистрировано увеличение абсолютного числа Т-хелперов ($P = 0,01$), в то время как у пациентов контрольной группы при втором обследовании выявлено снижение их содержания ($P = 0,013$).

Соотношение CD4/CD8 клеток является одним из традиционно используемых показателей, который позволяет охарактеризовать состояние клеточного иммунитета [20]. Данное соотношение не изменилось достоверно в ходе проведения иммунотерапии (до иммунотерапии – 1,28 (1,02–1,58), после терапии – 1,36 (1,01–1,64); $P = 0,465$), равно как не было установлено изменений данного показателя у пациентов контрольной группы ($P = 0,709$).

Расчет соотношения TCRab⁺ и TCRgd⁺CD3⁺ лимфоцитов при помощи метода рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса позволил установить наличие достоверных различий данного показателя между пациентами исследованных групп и здоровыми добровольцами ($H = 8,83$; $P = 0,01$).

Одной из важнейших молекул, экспрессированных на поверхности Т-лимфоцитов, является костимуляторная молекула CD28, которая является лигандом для молекул CD80 и CD86 на поверхности АПК и наряду с молекулами HLA, Т-клеточным рецептором, адгезивными молекула-

ми формирует иммунологический синапс. Снижение экспрессии молекулы CD28 и, следовательно, презентация антигена без сопутствующего костимуляторного сигнала приводит к анергии Т-лимфоцитов [20]. Неудивительно, что как относительное, так и абсолютное содержание CD28⁺CD3⁺ лимфоцитов было достоверно снижено у пациентов с РМЖ основной и контрольной групп, что отражает уменьшение костимуляторного потенциала Т-клеток (табл. 4). Установлено также достоверное увеличение абсолютного числа CD28⁺ Т-лимфоцитов у пациентов основной группы после проведения клинических испытаний ($P = 0,04$), чего не было выявлено у пациентов контрольной группы ($P = 0,009$) (табл. 4). Выявленное увеличение пула антивированных Т-клеток с фенотипом CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD69⁺ у пациентов контрольной группы в сравнении с данными здоровых добровольцев и пациентов основной группы указывает на гиперактивность Т-клеток.

Т а б л и ц а 4. Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов и ЕК-клеток у пациентов с РМЖ и у здоровых добровольцев

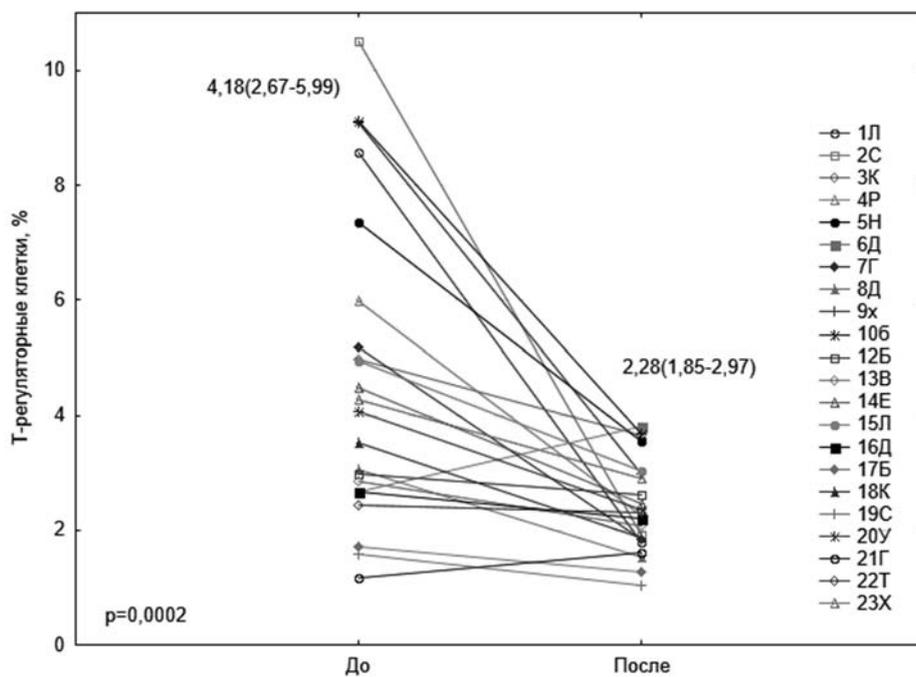
Группа	Популяция, %					Популяция, $\times 10^6/\text{мл}$				
	Активир Т-клетки CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	Активир Т-клетки CD3 ⁺ CD69 ⁺	CD28 ⁺ Т-клетки	Т-клетки памяти CD45R0 ⁺	ЕК-клетки	Активир Т-клетки CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	Активир Т-клетки CD3 ⁺ CD69 ⁺	CD28 ⁺ Т-клетки	Т-клетки памяти CD45R0 ⁺	ЕК-клетки
Осн. группа (n = 22): до терапии	9,5 (5,1–14,2)	4,6 (3,5–7,7)	46,6 (40,2–54,7)	44,0 (35,6–53,0)	7,4 (4,0–10,9)	18 (0,7–0,19)	0,06 (0,04–0,11)	0,63 (0,55–0,75)	0,55 (0,47–0,80)	0,28 (0,18–0,33)
P (со здор. добров.)	0,132	0,895	0,005	0,9387	0,019	0,783	0,111	0,0001	0,004	0,886
P (с контр. группой)	0,16	0,01	0,86	0,68	0,13	0,024	0,005	0,170	0,012	0,681
после терапии	7,9 (4,1–13,6)	8,5 (4,6–11,6)	45,9 (40,1–52,4)	44,8 (39,8–49,5)	11,6 (8,9–14,5)	0,11 (0,06–0,3)	0,12 (0,08–0,21)	0,74 (0,75–0,90)	0,69 (0,52–0,89)	0,35 (0,17–0,45)
P (до/после)	0,935	0,0142	0,259	0,935	0,0002	0,236	0,0156	0,0424	0,036	0,140
Контр. группа (n = 22): первое обслед.	12,0 (7,2–17,2)	9,4 (5,7–12,1)	47,3 (36,9–55,4)	47,0 (41,4–51,9)	9,9 (7,4–11,2)	0,19 (0,12–0,41)	0,16 (0,07–0,26)	0,79 (0,52–1,0)	0,72 (0,66–0,94)	0,3 (0,14–0,35)
P (со здор. добров.)	0,0009	0,003	0,001	0,3731	0,2438	0,018	0,097	0,009	0,198	0,461
второе обслед.	8,1 (5,6–12,5)	7,6 (5,0–9,5)	42,3 (33,8–48,0)	50,5 (45,0–53,9)	11,8 (9,6–16,4)	0,17 (0,10–0,21)	0,10 (0,07–0,20)	0,70 (0,49–0,84)	0,76 (0,65–1,01)	0,28 (0,18–0,40)
P (до/после)	0,050	0,277	0,001	0,050	0,014	0,082	0,338	0,291	0,445	0,808
Здор. добров. (n = 24)	5,8 (4,8–7,8)	4,7 (3,7–7,4)	59,1 (51,8–61,4)	45,5 (41,3–48,7)	11,4 (8,4–13,3)	0,1 (0,08–0,20)	0,12 (0,04–0,17)	1,13 (0,78–1,43)	0,87 (0,66–1,08)	0,3 (0,1–0,3)

Следует также отметить снижение абсолютного содержания Т-клеток памяти у пациентов с РМЖ основной группы и увеличение их содержания в процессе иммунотерапии ДК (табл. 4).

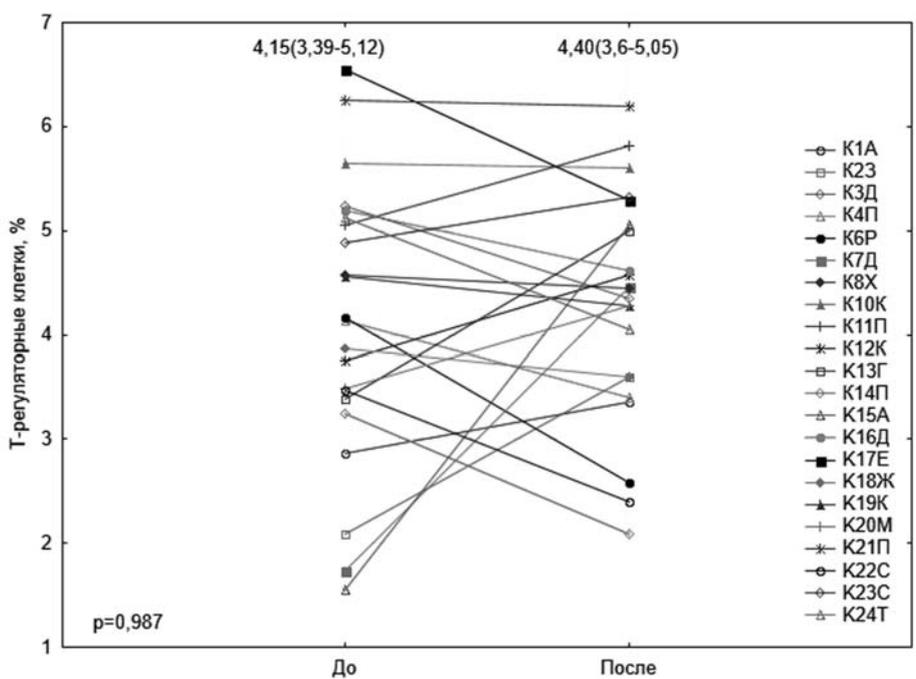
Т-регуляторные клетки (Т-рег), имеющие фенотип CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺, являются основными клетками системы иммунитета, обладающими иммуносупрессивной активностью [20, 21]. Во многих работах показано, что у пациентов с раком различной локализации число Т-рег увеличено как в периферической крови, так и в инфильтратах, окружающих опухоль. При этом большее число Т-рег ассоциировано с худшим клиническим прогнозом. В то же время уменьшение пула циркулирующих Т-рег у пациентов, страдающих раком, положительно коррелировало с продолжительностью безрецидивного периода, что позволяет использовать результаты определения Т-рег в качестве прогностического теста. Известно, что Т-рег способны посредством секреции ряда субстанций ослаблять функцию ДК и цитотоксических Т-лимфоцитов, наиболее важных в иммунной защите против злокачественных клеток. Помимо этого выявлена способность Т-рег стимулировать ангиогенез опухолей [22].

У пациентов основной и контрольной групп, а также у здоровых добровольцев содержание Т-регуляторных клеток при первичном обследовании значительно не отличалось и составило 4,18 (2,67–5,99) % в основной группе, 4,15 (3,39–5,12) % в контрольной группе и 4,0 (3,1–5,0) % в груп-

пе здоровых добровольцев. Выявлено существенное общегрупповое снижение содержания Т-регуляторных клеток после проведения иммунотерапии (до терапии – 4,18 (2,67–5,99) %, после терапии – 2,28 (1,85–2,97) %; $P = 0,0002$), что указывает на отсутствие развития иммунологической толерантности, активацию иммунного ответа и является благоприятным прогностическим признаком (рис. 1, а).



а



б

Рис. 1. Динамика содержания Т-регуляторных клеток (относительные значения) в периферической крови пациентов с РМЖ: а – у пациентов основной группы в процессе иммунотерапии ДК; б – у пациентов контрольной группы с интервалом в 12–18 мес.

Уменьшение пула Т-регуляторных клеток периферической крови более чем на 25 % выявлено у 17 (77,3 ± 8,9 %) из 22 пациентов. У пациентов 6Д и 21Г обнаружено увеличение относительно содержания Т-регуляторных клеток. У 3 пациентов (12Б, 16Д и 22Т) не выявлено значимого изменения процентного содержания Т-регуляторных клеток. Кроме того, у пациентов основной группы после проведения иммунотерапии обнаружено значимое уменьшение абсолютного числа Т-регуляторных клеток (до проведения иммунотерапии – 0,054 (0,036–0,081)·10⁶/мл, после иммунотерапии – 0,038 (0,029–0,056)·10⁶/мл; $P = 0,013$).

В то же время у 22 пациентов контрольной группы отмечалось разнонаправленное изменение содержания Т-регуляторных клеток: снижение – у 10 (45,5 ± 10,6 %), увеличение – у 3 (13,6 ± 7,3 %), без существенных изменений – у 9 (40,9 ± 10,5 %) (рис. 1, б). Таким образом, установлено, что содержание Т-регуляторных клеток уменьшилось у 77,3 ± 8,9 % пациентов основной группы, которых лечили ДК, и у 45,5 ± 10,6 % пациентов контрольной группы ($P = 0,03$).

Содержание ЕК-клеток у пациентов обеих групп достоверно увеличивалось (табл. 4). Абсолютное содержание В-лимфоцитов у пациентов основной группы после проведения иммунотерапии повысилось ($P = 0,0014$) (табл. 5). У пациентов контрольной группы также зафиксировано увеличение пула В-клеток памяти с течением времени, чего не выявлено у пациентов, которых лечили ДК.

Т а б л и ц а 5. Содержание В-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с РМЖ

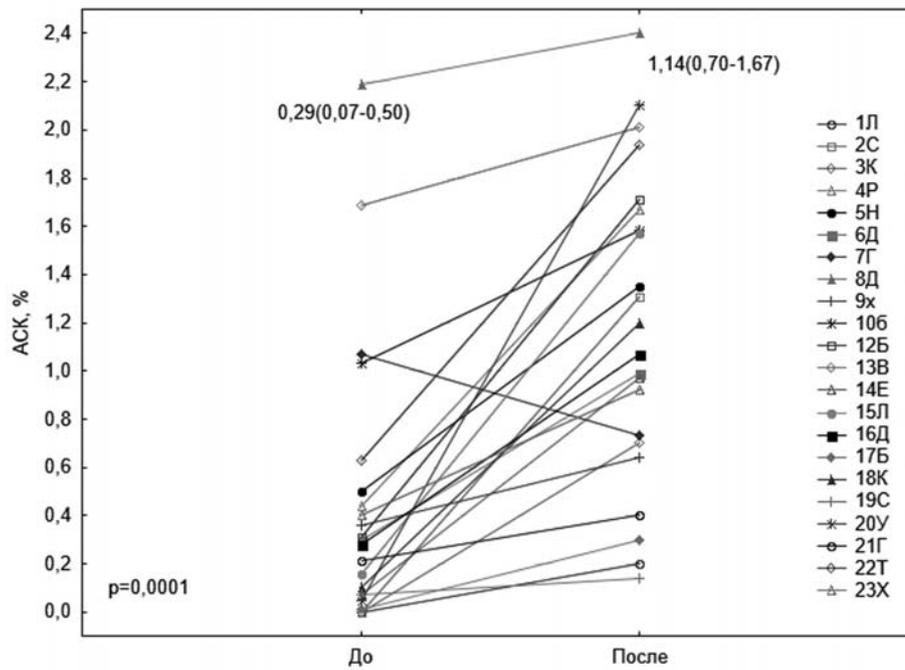
Группа	Популяция, %			Популяция, ×10 ⁶ /мл		
	В-клетки	В1-клетки	В-клетки памяти	В-клетки	В1-клетки	В-клетки памяти
Осн. группа (n = 22): до терапии	7,4 (4,0–10,9)	2,3 (1,2–3,1)	1,0 (0,6–1,6)	0,11 (0,06–0,16)	0,03 (0,02–0,04)	0,01 (0,007–0,02)
<i>P</i> (со здор. добров.)	0,019	0,3731	0,339	0,0004	0,006	0,489
<i>P</i> (с контр. группой)	0,13	0,06	0,86	0,07	0,015	0,392
после терапии	11,6 (8,9–14,5)	2,4 (1,4–3,5)	1,4 (0,86–1,83)	0,18 (0,14–0,22)	0,04 (0,02–0,06)	0,02 (0,01–0,03)
<i>P</i> (до/после)	0,0002	0,566	0,338	0,0014	0,168	0,131
Контр. группа (n = 22): первое обслед.	9,9 (7,4–11,2)	3,1(2,0–4,5)	1,1 (0,7–1,5)	0,14 (0,1–0,21)	0,04 (0,03–0,07)	0,02 (0,01–0,03)
<i>P</i> (со здор. добров.)	0,2438	0,2812	0,2482	0,12	0,691	0,991
второе обслед.	11,8 (9,6–16,4)	2,7 (1,6–3,6)	1,8 (1,0–2,2)	0,24 (0,14–0,27)	0,05 (0,02–0,09)	0,03 (0,02–0,05)
<i>P</i> (до/после)	0,014	0,858	0,003	0,05	0,808	0,009
Здор. добров. (n = 24)	11,4 (8,4–13,3)	2,7 (2,1–3,3)	0,9 (0,5–1,3)	0,21 (0,14–0,30)	0,05 (0,04–0,07)	0,02 (0,01–0,03)

Для оценки динамики формирования специфического иммунного ответа на терапию ДК использовали определение методом проточной цитометрии ИФН-γ-продуцирующих CD3⁺ Т-клеток после сокультивирования с антигеном (т. е. АСК) [23, 24].

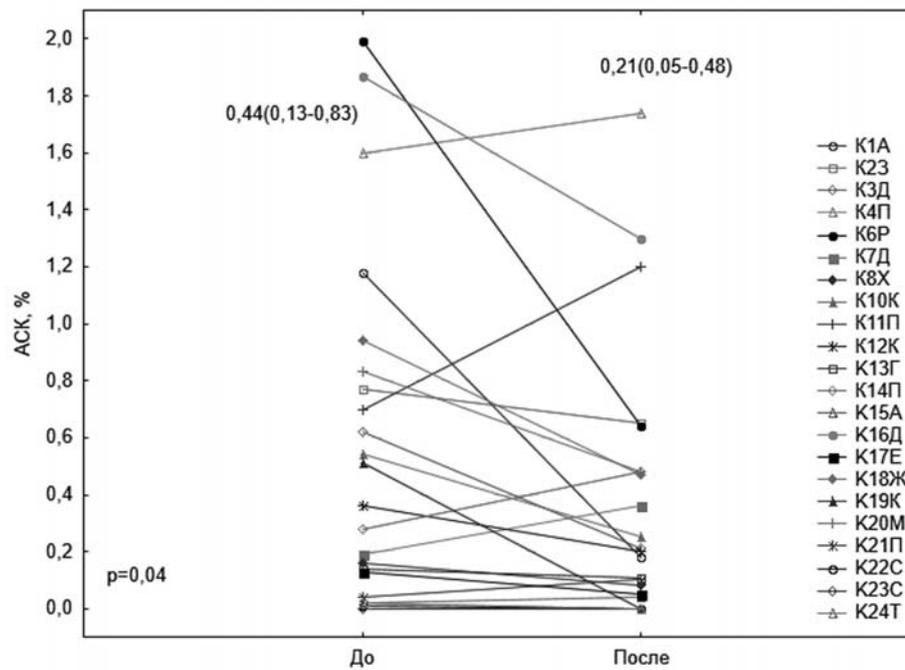
Оценка показателей специфического иммунного ответа до проведения иммунотерапии показала, что в экспериментальной группе у 15 (68,2 ± 9,9 %) пациентов из 22, а в контрольной – у 17 (77,3 ± 8,9 %) из 22 выявлены в крови АСК (учитывали значения свыше 0,1 %), что указывает на наличие иммунного ответа на антигены опухоли (рис. 1, б). Различий в числе пациентов, в крови которых были выявлены АСК, между контрольной и экспериментальной группами не установлено ($P = 0,498$). Значения, полученные в нашем исследовании, несколько выше, чем в работах других авторов (например, 41,7 ± 8,2 %), что обусловлено неоднородностью групп исследования и использованием разных методов для детекции АСК [25]. Относительное число АСК среди CD3⁺ лимфоцитов составило в контрольной группе 0,29 (0,07–0,50) %, в экспериментальной – 0,44 (0,013–0,83) % ($P = 0,379$).

Для изучения динамики накопления АСК после проведения иммунотерапии обследовано 22 пациента, завершивших программу испытаний. Число АСК составило 0,29 (0,07–0,50) % в начале лечения и 1,14 (0,70–1,67) % после курса иммунотерапии ($P = 0,0001$) (рис. 2, а).

Увеличение числа АСК выявлено у 18 (81,8 ± 8,2 %) пациентов из 22. У пациента 1Л с изначально недетектируемым количеством АСК число последних значительно не увеличилось и соста-



a



б

Рис. 2. Динамика содержания антигенспецифических клеток (относительные значения) в периферической крови пациентов с РМЖ: *a* – у пациентов основной группы в процессе иммунотерапии ДК; *б* – у пациентов контрольной группы с интервалом в 12–18 мес.

вило 0,2 %. У пациента 8Д изначально высокий уровень АСК увеличился незначительно – от 2,19 до 2,40 %, а у пациента 7Г – уменьшился с 1,07 до 0,73 %. Число АСК у пациента 19С в процессе иммунотерапии существенно не изменилось (0,07 % до терапии, 0,08 % после первого курса иммунотерапии и 0,14 % после завершения иммунотерапии).

Значимое увеличение пула АСК установлено у 3 ($13,6 \pm 7,3$ %) пациентов контрольной группы (К7Д, К11П и К14П) из 22. У 10 пациентов содержание АСК уменьшилось ($P = 0,04$), что указывает на угасание клеточного иммунного ответа в связи с отсутствием антигенной стимуляции.

Таким образом, у пациентов с РМЖ после проведения иммунотерапии с применением ДК не зарегистрировано признаков вторичного иммунодефицита: лейко- и лимфопении, снижения числа $CD3^+$ Т-лимфоцитов, Т-хелперов, $CD28^+$ лимфоцитов.

Установленное снижение числа Т-регуляторных клеток и увеличение пула АСК в крови большинства пациентов после проведения иммунотерапии указывает на усиление иммунного ответа на опухолеассоциированные антигены, которыми праймировали ДК.

Анализ клинической эффективности применяемого метода. В основе характеристики биологической агрессивности опухолей лежал комплексный анализ уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров злокачественных клеток. Проспективное исследование, выполненное на базе отдела клинической онкомамологии РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, позволило спрогнозировать агрессивность раннего РМЖ и определить наиболее уязвимые временные промежутки развития болезни у данной категории пациентов после первичного системного лечения по принятым стандартам. Длительность свободного от болезни периода определялась промежутком времени от хирургического лечения пациентов до возникновения первой метастатической опухоли либо локального рецидива.

Новые стандарты лечения, введенные с 2004 г., улучшили бессобытийную выживаемость (БСВ) пациентов, пролеченных по поводу ранних клинических стадий РМЖ. В то же время сохранилась тенденция прогрессирования болезни на третьем году послеоперационного периода, которая прослеживается при анализе БСВ популяционной группы пациентов, пролеченных после 2004 г. по поводу РМЖ $T_{1-2}N_{0-1}M_0G_{1-3}$: в первый год послеоперационного периода БСВ $91,2 \pm 1,0$ %, на третий год – $75,4 \pm 1,5$ % [26]. Аналогичные данные по изменению уровня БСВ к третьему году послеоперационного периода получены и в ретроспективной контрольной группе (РМЖ $T_2N_{0-1}M_0$) даже при средней степени гистологической злокачественности удаленных опухолей (стратификация по критерию G2): в год послеоперационного периода БСВ $97,7 \pm 1,2$ %, на третий год – $78,9 \pm 1,9$ %.

Сравнительный анализ БСВ пациентов, включенных в клинические испытания, с БСВ лиц популяционной и ретроспективной контрольной групп (пролеченных на базе отделения онкомамологии РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова) выявил удлинение свободного от болезни послеоперационного периода у пациентов в ходе клинических испытаний ($P < 0,05$). В настоящее время средняя продолжительность послеоперационного периода у пациентов основной группы составляет $41,0 \pm 1,9$ мес., средний временной промежуток после начала иммунотерапии – $25,2 \pm 1,6$ мес., эффективный противорецидивный период, связанный с противоопухолевой иммунотерапией, – $23,2 \pm 1,6$ мес.

В указанный период прогрессирование заболевания зарегистрировано у 1 из 22 пациентов, участвовавших в программе клинических испытаний. У данного пациента прогрессирование заболевания диагностировано через 13 мес. после выполненной операции и через 6 мес. после начала иммунотерапии. При компьютерной томографии обнаружены метастазы в теле Th_3 и нижней доле правого легкого. В данном случае, вероятно, изначально имели место клинически нераспознаваемые отдаленные микрометастазы, прогрессирующие в послеоперационном периоде за счет высокой агрессивности злокачественного процесса, подтверждаемой гиперэкспрессией онкомаркеров Her2/neu, Ki-67 и блокадой апоптоза клеток опухоли по гиперэкспрессии мутантного супрессорного протеина p53.

При анализе длительности свободного от болезни послеоперационного периода у пациентов, включенных в клинические испытания разрабатываемого метода, следует иметь в виду, что эта группа стратифицирована по критерию высокой биологической агрессивности клеток удаленных опухолей, а также по критерию T_2 (размер опухоли 2,0–5,0 см), что прогностически имеет более высокий риск прогрессирования болезни по сравнению с популяционной группой (РМЖ $T_{1-2}N_{0-1}$) и ретроспективной контрольной группой со средней степенью гистологической злокачественности (РМЖ $T_2N_{0-1}G_2$).

Учитывая, что, по результатам предыдущих исследований, случаи прогрессирования болезни с выявлением отдаленных метастазов статистически значимо регистрируется у данной категории пациентов на 2–3-й год послеоперационного периода, проведен сравнительный анализ трехлетней БСВ пациентов, участвующих в клинических испытаниях, и пациентов контрольной и популяционной групп (табл. 6).

Полученные результаты свидетельствуют об удлинении свободного от болезни периода и повышении БСВ пациентов в группе клинических испытаний с применением активной специфической аутоиммунотерапии. Кроме того, они являются показателем противорецидивного клинического эффекта, достигнутого после первичного комплексного лечения с применением иммунотерапии пациентов с ранним биологически агрессивным РМЖ и высоким риском прогрессирования болезни. Следует также отметить, что применяемый метод противорецидивной ДК-аутоиммунотерапии наряду с установленной эффективностью удовлетворительно переносится пациентами, не требуя применения лекарственной терапии и изменения графика проведения иммунотерапии.

Т а б л и ц а 6. Наблюдаемая бессобытийная выживаемость пациентов после первичного комплексного лечения РМЖ

Лечение	Бессобытийная выживаемость		
	1-й год	2-й год	3-й год
Популяционная группа ($T_{1-2}N_{0-1}$), лечение по стандартам 2004 г.	0,912 ± 0,010	0,809 ± 0,013	0,754 ± 0,015
Ретроспективная контрольная группа ($T_2N_{0-1}G_2$, $n = 133$) (РНПЦ ОМР)	0,977 ± 0,012	0,902 ± 0,011	0,789 ± 0,019
Основная группа (T_2N_{0-1} , $n = 22$), лечение по стандартам 2004 г. с применением иммунотерапии ДК	1,000 ± 0,000	0,954 ± 0,003*	0,954 ± 0,003*

Примечание. * – достоверность различий ($P < 0,05$) при сравнении показателей бессобытийной выживаемости у пациентов в группе клинических испытаний по отношению к контрольной и популяционной группам.

Заключение. Проведенные нами клинические испытания указывают на безопасность и хорошую переносимость аутологичных лечебных вакцин на основе ДК в противорецидивной терапии РМЖ. Наблюдение за пациентами не выявило побочных эффектов терапии в виде аллергических реакций, гриппоподобных симптомов, анемии, тромбоцитопении, нарушения функций почек и печени, а исследование иммунного статуса показало отсутствие признаков иммунодефицита или развития иммунологической толерантности на антиген р53 у пациентов после введения лечебных вакцин. Постинъекционные местные реакции были слабовыраженными и не требовали применения лекарственной терапии.

Для оценки ответа иммунной системы пациентов на введение ДК было выполнено исследование иммунного статуса, включавшее определение основных субпопуляций лимфоцитов, экспрессию ими молекул, характеризующих функциональную активность клеток иммунной системы, а также определение антигенспецифических Т-лимфоцитов. Установлено, что применение лечебных вакцин ассоциировано со значительным увеличением пула АСК в периферической крови и снижением содержания Т-регуляторных клеток, что указывает на активацию иммунного ответа на антигены опухоли и снижение в целом толерогенного потенциала иммунной системы. Полученные нами данные подтверждают факт избирательного стимулирования иммунной системы ДК в отношении определенных антигенов, установленный в ходе проведения других исследований (табл. 7).

Сравнительный анализ БСВ пациентов, включенных в клинические испытания, с БСВ лиц популяционной и ретроспективной контрольной групп показал удлинение свободного от болезни послеоперационного периода у пациентов в ходе клинических испытаний. Таким образом, анализ динамического клинико-лабораторного обследования пациентов указывает на клиническую и иммунологическую эффективность использования аутологичных антигенспецифических ДК в комплексном противорецидивном лечении пациентов с первичным агрессивным РМЖ.

Т а б л и ц а 7. Клинические испытания метода иммунотерапии РМЖ дендритными клетками

Авторы (руководители испытаний), год публикации	Краткая характеристика пациентов	К-во пациентов	Кратность введения	Способ введения	К-во ДК, $\times 10^6$	Антиген	Результаты
Brossart P. [5], 2000	Метастатический РМЖ с экспрессией HLA-A2 и HER-2/neu или MUC1	7	3–9	Подкожно	6,5 (2–17)	2 пептида – HER2/neu или MUC-1	Увеличение числа CD8 ⁺ АСК в периферической крови у 50 % пациентов. Временная стабилизация злокачественного процесса у 3 пациентов
Dees E. C. [6], 2004	Метастатический РМЖ	10	3–6	Подкожно	3–30	HER2/neu	Увеличение пула АСК у 20 % пациентов, частичный клинический ответ на терапию в виде стабилизации онкологического процесса у 30 % пациентов
Svane I. M. [7], 2004	Прогрессирующий РМЖ	6	7–10	Подкожно	7,1 (2,6–7,5)	Пептиды мутантного p53	Формирование АСК у 3 из 6 пациентов, стабилизация процесса – у 2 из 6
Svane I. M. [8], 2007	Метастатический РМЖ	26	3–10	Подкожно	5	6 пептидов мутантного p53	У 42 % пациентов стабилизация процесса. Увеличение числа АСК у 4 из 7 пациентов со стабилизацией РМЖ и у 2 из 9 пациентов с прогрессированием процесса
Szerniecki B. J. [9], 2007, Koski G. K. [10], 2014, Sharma A. [11], 2012	Протоковая карцинома in situ	27	4	Интранодально	10	7–8 пептидов HER2/neu	Увеличение числа CD4 ⁺ и CD8 ⁺ АСК у 88 % пациентов. Присутствие АСК сохранилось в периферической крови в течение 52 мес. после вакцинации. Трехгодичная выживаемость составила в основной группе 76,9 %, в контрольной – 31 %
Baek S. [12], 2011	РМЖ IIб–IV стадии	4	2	Подкожно	50	Лизат опухоли	Увеличение фракции АСК в крови и уменьшение пула Т-регуляторных клеток
Schwarzenberger P. O., [13], 2011	Метастатический РМЖ	24	3	Внутрикожно		Онкофетальный белок и рецептор к ламинину (OFP/iLRP)	Не представлены
Avigan D. [14], 2013	Метастатический РМЖ	41	4	Подкожно		Гибридные клетки – ДК, «слитые» с клетками опухоли пациента	Не представлены
Wood L. V. [15], 2014	РМЖ с высокой экспрессией Her2/Neu	До 65	5	Внутрикожно	5–20	ДК, трансдуцированные аденовирусным вектором, экспрессирующим антиген HER2/Neu	Не представлены
Настоящее исследование	РМЖ с экспрессией HLA-A2, KI-67 и мутантного p53	22	5	Подкожно	5,0 (3,3–7,0)	4 пептида мутантного p53	Увеличение фракции АСК в крови и уменьшение пула Т-регуляторных клеток

Литература

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2002–2011): анализ. обзор / Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии им. Н. Н. Александрова; Белорус. канцер-регистр; под ред. О. Г. Суконко. Минск, 2012. – 333 с.
2. Goldhirsch A., Wood W. C., Gelber R. D. et al. // *Ann. Oncol.* 2007. Vol. 18, N 7. P. 1133–1144.
3. Kataja V., Castiglione M. // *Ann. Oncol.* 2007. Vol. 18. Suppl. 2. P. ii5–ii8.
4. FDA Approves a Cellular Immunotherapy for Men with Advanced Prostate Cancer // FDA news release [Электронный ресурс]. – 2010. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm210174.htm>. – Дата доступа: 19.11.2013.
5. Brossart P. et al. // *Blood.* 2000. Vol. 96. P. 3102–3108.
6. Dees E. C. et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2004. Vol. 53. P. 777–785.
7. Svane I. M. et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2004. Vol. 53. P. 633–641.
8. Svane I. M. et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2007. Vol. 56. P. 1485–1499.
9. Czerniecki B. J. et al. // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67. P. 1842–1852.
10. Koski G. K. et al. // *J. Immunother.* 2012. Vol. 35. P. 54–65.
11. Sharma A. et al. // *Cancer.* 2012. Vol. 118. P. 4354–4362.
12. Soyung B. et al. // *J. Transl. Med.* [Электронный ресурс]. – 2011. – Vol. 9. – P. 178. – Режим доступа: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/178>. – Дата доступа: 19.11.2012.
13. Cellular Immunotherapy Study with Autologous Dendritic Cells Loaded with Oncofetal Antigen/iLRP in Patients with Metastatic Breast Cancer // U. S. National Institutes of Health Clinical Trials [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00879489>. – Дата доступа: 25.04.2014.
14. Vaccination of Patients with Breast Cancer with Dendritic Cell/Tumor Fusions and IL-12 // U. S. National Institutes of Health Clinical Trials [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00622401>. – Дата доступа: 25.04.2014.
15. Ad/HER2/Neu Dendritic Cell Cancer Vaccine Testing // U. S. National Institutes of Health Clinical Trials [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01730118>. – Дата доступа: 25.04.2014.
16. Иммуногистохимическая диагностика доброкачественных и злокачественных поражений молочной железы: руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей / под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. Казань, 2004. С. 110–116.
17. Тутов Л. П., Гончаров А. Е., Путырский Л. А. и др. // *Здравоохранение.* 2010. Т. 10. С. 52–55.
18. Реброва О. Ю. // Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М., 2008. – 312 с.
19. Genser B. et al. // *BMC Immunol.* [Электронный ресурс]. – 2007. – Vol. 8, N 27. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. – Дата доступа: 12.03.2012.
20. Тутов Л. П. Иммунология: терминологический словарь. М., 2008.
21. Palucka K., Banchereau J. // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. Vol. 12. P. 265–277.
22. Facciabene A. et al. // *Cancer Res.* 2012. Vol. 72. P. 2162–2171.
23. Curigliano G. et al. // *Ann. Oncol.* 2006. Vol. 17. P. 750–762.
24. Khanna K. M. et al. // *J. Immunol.* 2010. Vol. 85. P. 239–252.
25. Özcan M. et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. Vol. 125. P. 395–406.
26. Шаповал Е. В., Прудыбус И. С. // *Репродуктивное здоровье.* 2010. № 4. С. 130–140.

A. Y. HANCHAROU, L. P. TITOV, S. V. KOSHALEU, L. A. PUTYRSKY, A. C. DUBROVSKY, I. U. RAMANAVA,
M. I. KOSHALEVA, E. V. SHAPOVAL, R. M. SMOLYAKOVA, E. V. BESMAN

ANTI-RELAPSE IMMUNOTHERAPY OF PATIENTS WITH BREAST CANCER USING AUTOLOGOUS DENDRITIC CELL-BASED VACCINE

Summary

The aim of the current research was to assess the clinical and immunological efficacy of dendritic cell (DC)-based adjuvant immunotherapy in patients with Ki-67, p53 and HLA-A2 positive stage II breast cancer. There were 22 patients included in the trials and treated with DC. DCs were obtained from peripheral blood monocytes, primed with four p53 peptides and injected to the patient subcutaneously for 5 times. Safety and excellent tolerability of DC treatment was shown. In the current investigation the increase of ASC was established in $81.8 \pm 8.2\%$ of patients after the course of immunotherapy. The number of T-regs was decreased with treatment in $77.3 \pm 8.9\%$ of patients. After 3 years of DC-based therapy, relapse-free survival was $95.4 \pm 0.3\%$ in patients treated with DC and only $75.4 \pm 1.5\%$ in patients from the retrospective control group, suggesting the DC efficacy in preventing metastatic breast cancer.

РЕФЕРАТЫ

УДК 616:612.017.1

Гончаров А. Е., Титов Л. П., Кошелев С. В., Путырский Л. А., Дубровский А. Ч., Романова И. В., Кошелева М. И., Шаповал Е. В., Смолякова Р. М., Бесман Е. В. **Противорецидивная иммунотерапия рака молочной железы вакциной на основе аутологичных дендритных клеток** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 3. С. 4–19.

Проведены клинические испытания метода противорецидивной специфической адьювантной аутоиммунотерапии агрессивного рака молочной железы ранних клинических стадий с использованием дендритных клеток (ДК), праймированных пептидами мутантного протеина p53. В испытаниях участвовало 22 пациента с I–II клинической стадией, опухоли которых экспрессировали маркеры Ki-67, мутантный p53 и молекулу HLA-A2. Пациентам вводили 5-кратно аутологичные ДК. Анализ клинико-лабораторного обследования пациентов указывает на хорошую переносимость и безопасность проведенной терапии. В процессе иммунотерапии установлен прирост числа антигенспецифических Т-лимфоцитов в периферической крови у 81,8 ± 8,2 % пациентов и достоверное снижение содержания Т-регуляторных клеток у 77,3 ± 8,9 % пациентов, что указывает на иммунологическую эффективность метода. Показано положительное влияние иммунотерапии с помощью ДК на бессобытийную выживаемость (95,4 ± 3,0 %) в сравнении с аналогичным показателем в ретроспективной контрольной группе (78,9 ± 1,9 %).

Табл. 7. Ил. 2. Библиогр. – 26 назв.

УДК 616.718.5-001.5-089.82

Белецкий А. В., Шалатонина О. И., Кандыбо И. В., Бондарев О. Н., Ситник А. А. **Функциональный контроль эффективности хирургического лечения переломов проксимального отдела большеберцовой кости** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 3. С. 20–26.

Изучены показатели восстановления функционального состояния нервно-мышечной и сосудистой систем у пациентов с переломами мышечков проксимального отдела большеберцовой кости после хирургического лечения с помощью электромиографического, ультразвукового и реографического методов исследования. Показаны преимущества предложенного способа малоинвазивного остеосинтеза с применением конструкции собственной разработки по сравнению с традиционными методами открытой репозиции.

Табл. 2. Библиогр. – 17 назв.

УДК 615.272:577.15:547.562.1

Медведский И. Н. **Влияние серосодержащего производного 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина на активность Nrf2-зависимых ферментов эритроцитов и гомогенатов печени** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 3. С. 27–31.

В эксперименте на мышах установлено, что 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-*трет*-бутилпирокатехин ингибирует глутатион-S-трансферазы печени с $IC_{50} = 70$ мкмоль/л. Показано, что ингибирующая активность в отношении глутатион-S-трансфераз *in vitro* ассоциирована с индукцией Nrf2-зависимых ферментов *in vitro*.

Табл. 2. Ил. 1. Библиогр. – 16 назв.

УДК 616.127-005.8-06

Балыш Е. М., Статкевич Т. В., Патеев И. В., Картун Л. В., Митьковская Н. П. **Рецидивирующие коронарные события у пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда** // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2014. № 3. С. 32–37.

С помощью клинических, антропометрических, лабораторных, инструментальных и статистических методов исследования изучены клинико-инструментальные и лабораторные показатели у 184 пациентов (возраст от 35 до 84 лет) с острым крупноочаговым инфарктом миокарда (ИМ) и высоким кардиоваскулярным риском после эффективной тромболитической терапии (ТЛТ).