

ФАКТОРЫ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ХИМИОТЕРАПИИ С ОЗОНИРОВАННЫМИ СРЕДАМИ

Кит О.И.¹, Геворкян Ю.А.¹, Ильченко С.А.¹, Златник Е.Ю.¹, Новикова И.А.¹,
Непомнящая Е.М.¹, Солдаткина Н.В.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63), e-mail: ilchenkosergei@mail.ru

Проанализированы данные о 60 больных III стадией рака желудка, которым выполнена радикальная гастрэктомия с расширенной лимфодиссекцией D2. 30 больным (основная группа) проведено лечение, включающее радикальную операцию с интраоперационной химиотерапией с озонированными средами. 30 больным (контрольная группа) проведено лечение, включающее радикальную операцию без интраоперационного воздействия. В выделенных образцах ткани опухоли, перитуморальной зоны и линии резекции проводилось морфологическое исследование и иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии. Применение интраоперационной химиотерапии с озонированными средами благоприятно влияет на состояние локального клеточного иммунитета, способствует усилению лимфоцитарной инфильтрации в изучаемых образцах тканей желудка по сравнению с контрольной группой, с преобладанием в ткани опухоли содержания лимфоцитов Т-ряда (CD3+CD4+ и CD3+CD8+ в 1,2 и 2,2 раза, соответственно, $p < 0,05$), реализующих адаптивный клеточный иммунитет, над эффекторами адаптивного гуморального (В-клетки) и врожденного клеточного (NK) иммунитета; способствует выраженному повышению ($p < 0,05$) в ткани линии резекции уровня Т-лимфоцитов на 17,5% за счет CTL (увеличение на 54%), и NK-клеток (увеличение в 2,6 раза).

Ключевые слова: рак желудка, гастрэктомия, химиотерапия, озонированные среды, иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов, локальный клеточный иммунитет.

FACTORS OF LOCAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER AT APPLICATION OF CHEMOTHERAPY WITH OZONIZED MEDIA

Kit O.I.¹, Gevorgyan Y.A.¹, Ilchenko S.A.¹, Zlatnik E.Y.¹, Novikova I.A.¹,
Nepomnyashaya E.M.¹, Soldatkina N.V.¹

¹Federal State Budgetary Institution Rostov Cancer Research Institute Ministry of Health of Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia (344037, Rostov-on-Don, street 14th line, 63), e-mail: ilchenkosergei@mail.ru

Information on 60 patients with stage III gastric cancer after radical gastrectomy with extended D2 lymph node dissection is represented. 30 patients (the basic group) received the treatment, including radical surgery with intraoperative chemotherapy and ozonized media. 30 patients (control group) received the treatment, including radical surgery without intraoperative impact. In samples of tumor tissue, peritumoral area and line of resection was carried out morphological examination and immunophenotyping lymphocytes subsets the method of flow cytofluorometry. Application of intraoperative chemotherapy with ozonized media induced positive effect on the local cellular immunity. Was observed increased lymphocytic infiltration in the studied samples of the tissues of the stomach compared with the control group, with a predominance in the tumor tissue content of lymphocytes T-subsets (CD3+, CD4+ and CD3+CD8+ 1.2 and 2.2 times, respectively, $p < 0.05$). Thus factors of adaptive cellular immunity were found to prevail over effectors of the adaptive humoral (B-cells) and of innate cellular immunity (NK). Marked increase ($p < 0.05$) of T-lymphocytes by 17.5% for the account CTL (an increase of 54%), and NK cells (an increase of 2.6 times) in tissue resection line was observed.

Key words: gastric cancer, gastrectomy, chemotherapy, ozonized media, subsets lymphocytes immunophenotyping, local cellular immunity.

Введение

Несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости раком желудка, он остается одной из самых распространенных форм злокачественных опухолей. В России в структуре онкозаболеваемости рак желудка занимает 3-е место после рака легкого и кожи, и 2-е место в

структуре смертности после рака легкого [2]. Основным методом радикального лечения больных раком желудка является хирургический, но даже при местной распространенности опухолевого процесса радикальность оперативных вмешательств составляет 30-40% [3].

Для улучшения результатов лечения разрабатываются методы, включающие химиолучевое лечение, однако их возможности ограничены резистентностью опухоли, низкой толерантностью окружающих тканей и высокой токсичностью химиопрепаратов [5]. Поэтому важным подходом при лечении больных раком желудка являются способы введения и доставки химиопрепаратов к опухоли [6]. Перспективным направлением является применение различных модуляторов, повышающих эффективность химиопрепаратов и влияющих на результаты лечения, к которым относится и озонотерапия.

Местное и системное парентеральное применение озонированных растворов в комплексном лечении различной патологии вызывает, наряду с другими позитивными эффектами, благоприятную динамику системных и локальных иммунологических параметров. Исследования показали, что применение озона приводит к повышению уровня SIgA в слезной жидкости, нормализации показателей Т- и В-клеточного звеньев иммунной системы, снижению содержания провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 α , IL-6) и лактоферрина в крови и в ликворе на фоне возрастания уровня противовоспалительного цитокина IL-4 в ликворе [4; 7; 8]. Включение озонотерапии в комплексное лечение онкологических больных способствует не только получению клинического эффекта, но и запуску апоптоза [1]. Кроме того, описано снижение при озонотерапии сывороточного уровня sHLAI, вызывающего апоптоз CD3+CD8+ (CTL), чем можно объяснить протекторное действие озона на цитотоксические Т-лимфоциты, а также указано на стимуляцию экспрессии рецепторов CD50 и CD71 (участвующих в адгезии и активации) на мононуклеарных клетках [9].

Таким образом, имеется ряд данных об участии иммунной системы в реализации эффектов озонотерапии при различных заболеваниях. Ее иммуотропное действие может быть вторичным по отношению к антимикробному и противовоспалительному, но может и играть существенную самостоятельную патогенетическую роль при онкологических заболеваниях, демонстрируя разнонаправленное влияние на апоптоз опухолевых и мононуклеарных клеток.

Цель

Изучить влияние интраоперационной химиотерапии с озонированными средами на состояние локального иммунитета у больных резектабельным раком желудка.

Материал и методы

Проанализированы данные о 60 больных III стадией местно распространенного рака желудка, которым была выполнена радикальная гастрэктомия с расширенной лимфодиссекцией в объеме D2 в отделении общей онкологии ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ.

Больные были распределены на две группы. Основную группу составили 30 больных, которым проведено лечение, включающее радикальную операцию с интраоперационной химиотерапией с озонированными средами. Контрольную группу составили 30 больных, которым проведено лечение, включающее радикальную операцию без интраоперационного воздействия.

Сравнительная характеристика групп больных по возрасту, полу, гистологической структуре и степени распространенности опухоли, сопутствующей патологии не выявила достоверных различий, что позволило провести анализ результатов лечения.

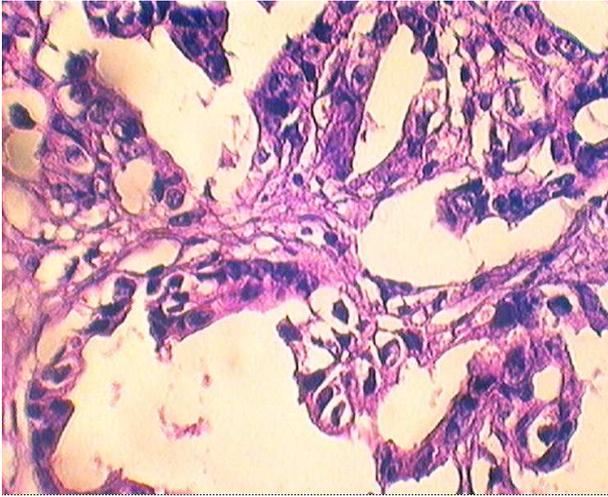
Для проведения лечения с применением химиотерапии с озонированными средами больным основной группы при проведении стандартной гастрэктомии, после мобилизации желудка, выделяли левую желудочную артерию и вену, их перевязывали и пересекали. Левые желудочно-сальниковые сосуды и короткие желудочные сосуды не пересекали, по ним осуществлялся сброс крови и препаратов в общий кровоток. Катетеризировали культю левой желудочной артерии, вводили 50 мл озонированного физиологического раствора (концентрация озона - 1000 мкг/л) в течение 5 минут. Через 5 мин вводили оксалиплатин в дозе 85 мг/м² на 150 мл 5%-ной глюкозы. После 30-минутной экспозиции выполняли гастрэктомию. Также во время операции внутривенно вводили 100 мл озонированной аутокрови (с концентрацией озона 400 мкг/л) со скоростью 40 капель в минуту. С интервалом 5 минут вводили лейковорин 100 мг/м² и 5-фторурацил 500 мг/м² (получен патент РФ № 2428993. 2011. Бюл. № 26).

Дальнейший ход операции осуществлялся по стандартной методике и не имел отличий от проведения больным контрольной группы.

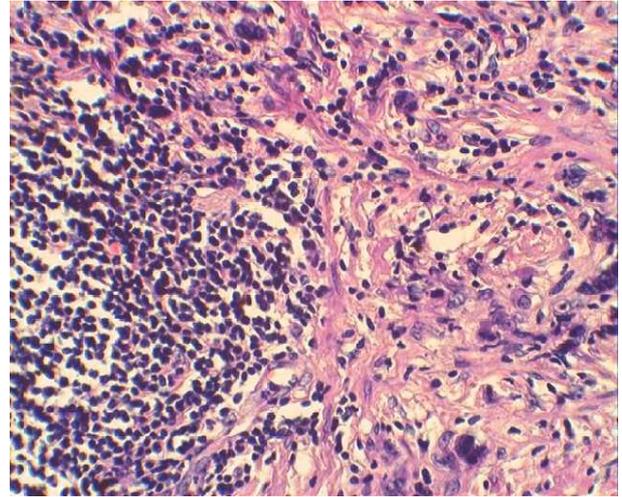
Проводилось плановое морфологическое исследование удаленного желудка и лимфатических узлов. Гистологический материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине со стандартной проводкой, заливкой в парафин и окраской гематоксилином и эозином. В выделенных образцах ткани опухоли, перитуморальной зоны (на расстоянии 3 см от опухоли) и линии резекции проводилось иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Определяли субпопуляционный состав Т- (Т-общие - CD3+, хелперно-индукторные - CD4+, цитотоксические - CD8+) и В-лимфоцитов (CD19+), а также натуральных киллеров NK (CD16+CD56+).

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование показало, что в основной группе по линии резекции отмечается повышенная лимфоцитарная инфильтрация (рисунок 1). Морфологическая картина опухоли характеризовалась наличием выраженного отека вокруг желудочных желез и пластов опухолевых клеток (рисунок 1).



**х 400 Выраженный отек вокруг
опухолевых клеток и желез**



**х 200. Выраженная лимфоцитарная
инфильтрация по линии резекции**

Рисунок 1. Морфологическая картина рака желудка после применения химиотерапии с озонированными средами (окраска гематоксилином-эозином)

Обращало внимание изменение структуры опухолевых клеток: увеличение в размерах ядер с дистрофическими и некробиотическими признаками, появление в цитоплазме вакуолей. Отмечалось незначительное содержание нейтрофилов и повышенная агранулоцитарная инфильтрация со значительным преобладанием лимфоцитов – признака локальных иммунных реакций. В контрольной группе описанных изменений не наблюдалось.

Различия состава субпопуляций лимфоцитов в соответствующих образцах тканей больных основной и контрольной группы представлены в таблице 1. Результаты исследования показали, что у больных контрольной группы в ткани опухоли содержится статистически значимо меньше зрелых Т-клеток по сравнению с тканью линии резекции и перитуморальной зоны. Эта разница обусловлена более низким уровнем CD3+CD8+ клеток в ткани опухоли (в 2 раза меньшим, чем в ткани по линии резекции, и в 3 раза меньшим, чем в перитуморальной зоне). При этом в ткани опухоли и перитуморальной зоне присутствует значительное количество NK-клеток, в 2-3 раза превышающее их уровень по линии резекции. Содержание CD3+CD4+ клеток, а также CD19+(В-лимфоцитов) в опухоли соответствует их уровню по линии резекции, однако оно оказалось минимальным в перитуморальной зоне.

Уровень CD3+ во всех исследованных образцах тканей больных основной группы превышал уровень контрольной группы ($p < 0,05$). Содержание CD3+CD4+ в опухоли является максимальным, достоверно превышая как показатель контрольного образца в 1,2 раза, так и линии резекции и перитуморальной области внутри группы в 1,1 раза. В ткани перитуморальной области количество CD3+CD4+ оказалось в 1,4 раза выше ($p < 0,05$), чем в контрольном образце. Содержание CD3+CD8+ в опухоли при действии химиотерапии с

озонированными средами было хотя и ниже в 1,4 раза ($p<0,05$), чем в ткани по линии резекции, но в 2,2 раза выше ($p<0,05$), чем в контроле. Уровень В-клеток по линии резекции оказался в 3,6 раза ниже, чем в контроле, а уровень CD16+CD56+ – в 2,6 раза выше ($p<0,05$). Количество NK-клеток в ткани опухоли и перитуморальной области основной группы было достоверно ниже в 1,3 и 1,5 раза, чем по линии резекции.

Таблица 1

Уровень субпопуляций лимфоцитов в ткани опухоли желудка, перитуморальной зоне и линии резекции у больных основной и контрольной группы

Показатель, %	Основная группа (n=30)			Контрольная группа (n=30)		
	ткань опухоли	перитуморальная зона	линия резекции	ткань опухоли	перитуморальная зона	линия резекции
CD ³⁺	66,1±6,2 ³	65,9±5,9 ³	70,2±5,7 ³	46,7±3,0 ^{1,2}	56,1±3,8	59,7±4,4
CD ³⁺ CD ⁴⁺	44,4±2,7 ^{1,2,3}	38,2±3,4 ³	38,0±2,9	35,8±3,2 ²	27,0±2,9 ¹	38,1±3,3
CD ³⁺ CD ⁸⁺	21,0±4,0 ^{1,3}	24,8±3,5	30,5±3,7 ³	9,5±2,8 ^{1,2}	27,2±3,8	19,8±5,4
CD ¹⁹⁺	16,5±4,2 ^{1,3}	18,3±3,7 ¹	8,2±3,2 ³	29,7±4,1 ²	18,1±3,7 ¹	29,7±3,5
CD ¹⁶⁺ CD ⁵⁶⁺	16,0±3,1 ¹	15,1±3,3 ^{1,3}	22,4±3,2 ³	22,0±4,2 ¹	23,1±3,7 ¹	8,4±3,8

Примечание:

¹ - статистически достоверные отличия от линии резекции ($p<0,05$);

² - статистически достоверные отличия от перитуморальной зоны ($p<0,05$);

³ - статистически достоверные отличия от контрольной группы ($p<0,05$).

Поскольку лечебное воздействие в виде химио- и озонотерапии является интраоперационным, состояние ткани, расположенной по линии резекции, имеет, на наш взгляд, наибольшее значение для дальнейшего течения заболевания. В связи с этим следует обратить особое внимание на выраженные благоприятные отличия локального клеточного иммунитета именно этой области. Применение предлагаемого нами варианта лечения способствует позитивным изменениям факторов локального иммунитета в немалигнизированной ткани линии резекции, а именно приводит к значительному повышению содержания лимфоцитов, способных к проявлению цитотоксической активности и относящихся к факторам как врожденного (NK), так и адаптивного (CTL CD³⁺CD⁸⁺) иммунитета, хотя они и являются рециркулирующими клетками.

Итак, полученные результаты свидетельствуют о том, что проведение интраоперационной регионарной и системной химиотерапии с применением озонированных сред влияет не только на состояние опухоли, но и прилежащих тканей, включая перитуморальную зону и линию резекции.

При оценке ближайших результатов лечения больных основной группы в сроки наблюдения от 18 до 24 месяцев установлено, что признаки генерализации опухолевого процесса наблюдались у 7 (23,3%) больных. Показатели локального иммунитета этих больных были сопоставлены с теми, у кого была показана положительная клиническая динамика без признаков прогрессирования заболевания (таблица 2-4).

Таблица 2

Уровень субпопуляций лимфоцитов в ткани опухоли у больных основной группы с различным клиническим эффектом

Показатель, %	Основная группа больных (n=30)		
	вся группа	положительный эффект (n=23)	отсутствие эффекта (n=7)
CD ³⁺	66,1±6,2	68,8±3,2 ¹	57,2±5,7
CD ³⁺ CD ⁴⁺	44,4±2,7	44,8±2,0 ¹	38,2±2,3
CD ³⁺ CD ⁸⁺	21,0±4,0	22,0±3,6 ¹	17,4±3,5
CD ¹⁹⁺	16,5±4,2	15,2±3,3 ¹	20,8±3,9
CD ¹⁶⁺ CD ⁵⁶⁺	16,0±3,1	14,6±2,1 ¹	20,5±3,2

Примечание:

¹ – статистически достоверные отличия в зависимости от клинического эффекта, в пределах группы (p<0,05).

Таблица 3

Уровень субпопуляций лимфоцитов в перитуморальной зоне у больных основной группы с различным клиническим эффектом

Показатель, %	Основная группа больных (n=30)		
	вся группа	положительный эффект (n=23)	отсутствие эффекта (n=7)
CD ³⁺	65,9±5,9	68,1±2,7 ¹	58,5±7,8
CD ³⁺ CD ⁴⁺	38,2±3,4	39,3±2,4 ¹	34,8±4,1
CD ³⁺ CD ⁸⁺	24,8±3,5	26,0±2,4 ¹	21,1±4,0
CD ¹⁹⁺	18,3±3,7	17,2±3,0 ¹	21,8±3,8
CD ¹⁶⁺ CD ⁵⁶⁺	15,1±3,3	13,9±1,5 ¹	18,8±4,8

Примечание:

¹ – статистически достоверные отличия в зависимости от клинического эффекта, в пределах группы (p<0,05).

Таблица 4

Уровень субпопуляций лимфоцитов по линии резекции у больных основной группы с различным клиническим эффектом

Показатель, %	Основная группа больных (n=30)		
	вся группа	положительный эффект (n=23)	отсутствие эффекта (n=7)
CD ³⁺	70,2±5,7	71,7±2,0 ¹	65,5±10,7
CD ³⁺ CD ⁴⁺	38,0±2,9	38,4±1,5	36,5±5,5
CD ³⁺ CD ⁸⁺	30,5±3,7	31,6±1,9 ¹	26,7±5,6
CD ¹⁹⁺	8,2±3,2	7,0±1,3 ¹	11,7±5,0
CD ¹⁶⁺ CD ⁵⁶⁺	22,4±3,2	22,2±1,7	23,5±6,2

Примечание:

¹ – статистически достоверные отличия в зависимости от клинического эффекта, в пределах группы (p<0,05).

Как видно из представленных таблиц 2-4, при отсутствии эффекта у больных основной группы в опухоли, перитуморальной зоне и по линии резекции отмечены наиболее низкие (p<0,05) (таблица 2-3), показатели Т-клеток (CD³⁺, CD³⁺CD⁴⁺, CD³⁺CD⁸⁺), а уровни В- (CD¹⁹⁺) и NK- (CD¹⁶⁺CD⁵⁶⁺) клеток были максимальными (p<0,05) (таблица 2-3). В целом у больных основной группы при отсутствии эффекта наблюдается сходная картина с больными контрольной группы, хотя показатели были выше, чем в последней.

Итак, можно предположить, что эффективность лечения основной группы больных связана с уровнем клеточных факторов локального иммунитета, среди которых основную роль играет накопление в исследуемых образцах тканей Т-лимфоцитов с рецепторами CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+.

Таким образом, полученная характеристика факторов локального клеточного иммунитета при раке желудка свидетельствует о влиянии на них предложенного метода лечения. Это влияние развивается быстро (в течение 30-минутной инкубации в оперируемом органе) и, по-видимому, не может быть связано с пролиферацией лимфоцитов и их миграцией из лимфоидных органов. Тем не менее усиление их миграции из сосудов микроциркуляторного русла представляется возможным, с учетом влияния озона на проницаемость сосудистой стенки или на адгезивные свойства эндотелия. Вероятно, некоторые из разновидностей лимфоцитов оказались более чувствительными к введению оксалиплатина и озонированных сред. Скорее всего, это В-клетки, уровень которых в опухоли, и особенно в ткани по линии резекции, снижается по сравнению с контролем. При этом происходит перераспределение процентного содержания в пользу более устойчивых к примененным воздействиям клеток, в частности возрастает доля CD3+CD4+ и CD3+CD8+ в опухоли, что формирует локальное преобладание лимфоцитов Т-ряда, реализующих адаптивный клеточный иммунитет, над эффекторами адаптивного гуморального (В-клетки) и врожденного клеточного (NK) иммунитета.

Изменения в ткани линии резекции могут вносить значительный вклад в обеспечение длительности бессобытийного периода после хирургического этапа лечения. Поэтому важным является отмеченное нами выраженное повышение содержания Т-лимфоцитов за счет CTL, а также NK-клеток в ткани линии резекции основной группы. Мы предполагаем, что присутствие высокого числа этих клеток может способствовать предотвращению развития рецидивов, которое не наблюдалось у больных основной группы и встречалось у 2 (6,6%) больных контрольной группы.

Выводы

Применение интраоперационной химиотерапии с озонированными средами благоприятно влияет на состояние локального клеточного иммунитета, способствует усилению лимфоцитарной инфильтрации в изучаемых образцах тканей желудка по сравнению с контрольной группой, с преобладанием в ткани опухоли содержания лимфоцитов Т-ряда (CD3+CD4+ и CD3+CD8+ в 1,2 и 2,2 раза, соответственно, $p < 0,05$), реализующих адаптивный клеточный иммунитет, над эффекторами адаптивного гуморального (В-клетки) и врожденного клеточного (NK) иммунитета; способствует выраженному повышению ($p < 0,05$)

в ткани линии резекции уровня Т-лимфоцитов на 17,5% за счет CTL (увеличение на 54%), и НК-клеток (увеличение в 2,6 раза).

Список литературы

1. Алясова А.В., Пегов Р.Г., Михайлова Е.М., Новиков В.В., Барышников А.Ю. Содержание растворимой формы молекул HLA I класса в сыворотке крови больных раком молочной железы и лёгкого // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. - Т. 7. - № 1. - С. 3-3.
2. Данилова И.А. Клинико-морфологический и популяционный анализ рака желудка с оценкой критериев выживаемости : дис. ... докт. мед. наук. - СПб., 2011. – 297 с. : ил.
3. Давыдов М.И., Туркин И.Н., Полоцкий Б.Е., Стилиди И.С., Левицкий А.В. Ранний рак желудка. Результаты хирургии раннего рака желудка // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – № 9 (550). – С. 2-4.
4. Неверова Е.А. Патогенетическое обоснование применения озона при эндогенных увеитах : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Саранск, 2007. – 116 с. : ил.
5. Скоропад В.Ю. Рациональная тактика лечения местно-распространенного рака желудка: место лучевой терапии // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, № 1. – С. 28-35.
6. Трякин А.А. Лечение местно-распространенного рака желудка: роль химиотерапии // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10, № 1. – С. 36-40.
7. Фисталь Э.Я., Козинец Г.П., Самойленко Г.Е., Носенко В.М., Фисталь Н.Н., Солошенко В.В. Комбустриология : учебник. – Донецк, 2005. – 315 с.
8. Шестериков Я.А. Клинико-иммунологическое обоснование применения медицинского озона в комплексной терапии посттравматических менингитов и менингоэнцефалитов : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Новосибирск, 2008. – 116 с. : ил.
9. Янченко О.С., Конторщикова К.Н., Новиков В.В. Барышников А.Ю. Воздействие озонотерапии на популяционный состав лимфоцитов при раке тела матки и миоме матки // Российский биотерапевтический журнал. - 2006. – С. 4-7.

Рецензенты:

Николаева Н.В., д.м.н., н.с. отделения онкогематологии ФГБУ «РНИОИ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, асс. кафедры онкологии ГБОУ ВПО «РостГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону.

Каймакчи О.Ю., д.м.н., асс. кафедры онкологии ГБОУ ВПО «РостГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону.