

ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

Меньшенина А.П.¹, Златник Е.Ю.¹, Моисеенко Т.И.¹, Франциянц Е.М.¹,
Новикова И.А.¹, Вереникина Е.В.¹, Сагакянц А.Б.¹, Бондаренко Е.С.¹, Шульгина О.Г.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Больным раком шейки матки (17 больных, стадия T2b-4aN0-1M0-1) проводили лечение, включающее полихимиотерапию и многокурсовую иммунотерапию дендритно-клеточной вакциной (ДКВ). Изучали переносимость ДКВ, клинический эффект, динамику показателей клеточного иммунитета методом проточной цитометрии (CD45+, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16/56+, CD3+CD4-CD8-, CD3+CD16+/56+, T-regs CD4+CD25+CD127dim, Т-клетки памяти: CD3+CD4+CD45RO+CD45RA-, CD3+CD8+CD45RO+CD45RA-; наивные Т-лимфоциты CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-CD62L+; CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CD62L+). Контрольная группа (19 больных) получала стандартное лечение. Результаты: в динамике 4 курсов лечения, включающего дендритно-клеточную вакцину, не выявлено изменений показателей клеточного иммунитета у больных, однако после 8–19 курсов лечения с иммунотерапией наблюдается положительная динамика в виде повышения уровней цитотоксических лимфоцитов врожденного (NK) и адаптивного (CD8+) иммунитета при снижении содержания Т regs; несмотря на снижение общего уровня CD3+CD4+ клеток, отмечено повышение процента Т-хелперных лимфоцитов памяти. Подобные изменения сохраняются у больных и после выхода в ремиссию, при этом у них возрастает уровень цитотоксических Т-клеток памяти, что, по-видимому, и поддерживает ее. Вакцинация аутологичной дендритно-клеточной вакциной удовлетворительно переносится больными и при применении в комплексном лечении вызывает клинический эффект.

Ключевые слова: рак шейки матки, дендритные клетки, вакцинация, иммунный статус, химиотерапия

IMMUNE STATUS OF CERVICAL CARCINOMA PATIENTS UNDERGOING TREATMENT WITH DENDRITIC VACCINE

Menshenina A.P.¹, Zlatnik E.Yu.¹, Moiseenko T.I.¹, Frantziantz E.M.¹,
Novikova I.A.¹, Verenikina E.V.¹, Sagakiantz A.B.¹, Bondarenko E.S.¹, Shulgina O.G.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Patients with cervical carcinoma (n=17, st.T2b-4aN0-1M0-1) were subjected to treatment including chemotherapy and immunotherapy with dendritic cells vaccination (DCV). Clinical effect, tolerance and immune status of the patients were studied in the dynamics of treatment by flow cytometry with the estimation of the levels of CD45+, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16/56+, CD3+CD4-CD8-, CD3+CD16+/56+, T-regs: CD4+CD25+CD127dim, memory T-cells: CD3+CD4+CD45RO+CD45RA-, CD3+CD8+CD45RO+CD45RA-; naive T-lymphocytes: CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-CD62L+; CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CD62L+. The control group of 19 patients was treated with standard chemotherapy. The results showed that 4 courses of treatment including chemotherapy and DCV induced no marked changes in the levels of the studied indices. After 8-19 courses of the treatment with immunotherapy positive immunologic dynamics developed resulting in the increase of the levels of cytotoxic lymphocytes participating in innate (NK) and adaptive (CD8+) immunity and diminishing of T regs. In spite of the reduction of the total CD4+ cells' level the growth of the memory Th-cells was seen. Similar changes persisted when the patients achieved the remission, along with the rise of memory T-cells' levels, which as we consider, maintains it. Thus immunization with auto-DCV is satisfactory tolerable by the patients and causes clinical effect in complex treatment.

Keywords: cervical carcinoma, dendritic cell, vaccination, immune status, chemotherapy

Разработка методов иммунотерапии, в частности с помощью вакцин, для лечения злокачественных опухолей является одним из приоритетных направлений в онкологии. На протяжении многих лет различными авторами предлагались разнообразные методы вакцинотерапии опухолей – от применения БЦЖ при опухолях, игравшей роль

неспецифического иммуностимулятора, до использования современных клеточных технологий. Развитие представлений о значении вирусов в онкогенезе некоторых злокачественных новообразований привело к разработке и применению противовирусных вакцин. Например, вакцина против вируса папилломы человека применяется с целью профилактики рака шейки матки (РШМ) [1, 2]. Получение и испытание противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток открывают новые возможности иммунотерапии злокачественных опухолей [3-5]. Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антиген-представляющими клетками, участвующими в иммунном ответе благодаря своей способности активировать не только «наивные» CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты, но и Т-клетки памяти паракортикальных зон периферических лимфоидных органов. У онкологических больных происходит угнетение функциональной активности ДК, как и остальных иммунокомпетентных клеток, вследствие чего нарушается процесс презентации и распознавания антигена [6]. Кроме того, будучи аутологичными, опухолевые антигены низкоиммуногенны. Совокупность причин, связанных, с одной стороны, с характером антигена, а с другой – с состоянием иммунной системы организма больного, приводит к неполноценной иммунной реакции на опухоль, для преодоления которой сконструированы и применяются ДК-вакцины (ДКВ) [7, 8].

Наиболее значимых успехов удалось достичь при ДК-вакцинотерапии иммуногенных опухолей, которыми считаются меланома, почечно-клеточный рак, некоторые лимфомы [9, 10].

В РНИОИ была получена вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), генерированных из мононуклеаров периферической крови больных РШМ, взятых до начала лечения. Метод ее получения описан нами ранее [11], защищен патентом РФ [12].

Целью данной работы является оценка иммунного статуса у больных РШМ при применении ДК-вакцины в их комплексном лечении.

Материалы и методы исследования. В качестве основной группы в исследование включены 17 больных РШМ T2b-4aN0-1M0-1 стадий. Получение ДКВ, нагруженной антигеном культуральной линии рака шейки матки HeLa, и ее введение в сочетании с химиолучевой терапией осуществлялись по ранее описанному способу [10]. Продолжительность вакцинотерапии планировалась индивидуально и зависела от эффекта лечения, который оценивали по данным осмотра, УЗИ, СРКТ, МРТ.

Контрольную группу составили 19 больных РШМ, получавших стандартное лечение: полихимиотерапию (ПХТ) и лучевую терапию по общепринятым методикам. Группу сравнения составляли 12 здоровых женщин.

Для оценки показателей клеточного иммунитета больных кровь до начала и на этапах

лечения брали из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА). Определяли популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов на проточном цитометре FACSCantoII (BD) с панелью моноклональных антител Т-, В-, NK (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56); дополнительно изучали количественное содержание Т-регуляторных (Т regs) клеток (CD4+CD25+CD127dim), а также Т-клеток памяти (Тm) с фенотипом CD3+CD4+CD45RO+CD45RA-, CD3+CD8+CD45RO+CD45RA- и наивных Т-лимфоцитов (Th0) с фенотипом CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-CD62L+ и CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CD62L+.

Результаты выражали в процентах от общего количества лимфоцитов, для Т regs в процентах от CD3+CD4+ клеток, для Тm и Th0 – в процентах от CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток. Вычисляли соотношение Тm/Th0 для каждой из этих субпопуляций лимфоцитов.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических методов (критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей).

Результаты исследования и их обсуждение. Трём больным St T2bN1M0 после проведения 3 курсов ПХТ в сочетании с 6 циклами ДКВ выполнено стандартное хирургическое лечение с последующей лучевой терапией. Срок наблюдения больных без рецидивов и прогрессирования заболевания составил от 6 до 18 месяцев.

Пяти больным St T3b-IVaN1M0-1 после эффективной вакцинохимиотерапии завершили лечение полноценной стандартной химиолучевой терапией с полной регрессией опухоли. Сроки наблюдения без прогрессирования – от 4 до 24 месяцев.

Пяти больным T2bN1M0 вакцинотерапия проводилась на фоне прогрессирования рака шейки матки после завершения стандартного лечения. У всех больных достигнута стабилизация процесса. Купирование болевого синдрома у всех больных отмечено после проведения 2–3 введений ДКВ.

Трём больным T2bN1M0 с первично не излеченными химиолучевой терапией опухолями шейки матки проведение вакцинотерапии на фоне второй линии химиотерапии позволило добиться полной регрессии опухоли. Сроки наблюдения за больными без прогрессирования и рецидива составили от 12 до 26 месяцев.

У двух больных T2bN0M0 с высоким риском рецидивирования после завершения стандартного комплексного лечения вакцинотерапия применялась в качестве адъювантной терапии.

Одной больной с исходно установленной St T4aN1M1 (инвазия в мочевой пузырь, нижнюю треть мочеточников, двухсторонние нефростомы, критический уровень шлаков, анемия III степени, кахексия) вакцинотерапия проводится с паллиативной целью в качестве

единственного варианта лечения в течение 13 месяцев.

Результаты иммунологических исследований представлены в таблице 1, в которой приведена динамика исследованных показателей после 4 курсов, 8–19 курсов ДКВ, а также во время достигнутой ремиссии после проведенного лечения. В таблице 1 также представлены показатели больных контрольной группы, получавшей ПХТ без иммунотерапии.

Таблица 1

Динамика показателей иммунного статуса у больных РШМ, получавших лечение, включающее ДКВ (Т-, В-, НК-клетки), по сравнению с контрольной группой

Группы больных	Сроки исследования	Показатели, %					
		CD3+	CD3+ CD4+	CD3+ CD8+	CD16/56 +	CD19+	T regs
Основная	До начала лечения	74,9±2,7	48,7±4,2	21,9±1,8	12,0±2,0	13,0±3,4	6,7±0,5
	1 курс ДКВ	70,4±3,1	51,0±5,1	19,0±2,0	17,1±4,2	12,5±2,9	8,8±0,3 * ●
	4 курса ДКВ	72,1±4,2	44,4±3,1 ●	23,6±3,2	14,5±1,9	13,6±2,4	7,2±1,3
	8–19 курсов ДКВ	65,0±2,1 * ***	32,9±2,3 * *** ●	28,8±1,5 * ●	21,2±3,0 * ***	12,5±1,9	6,1±0,8 ** ***
	Ремиссия	62,8±2,2 * *** ●	37,7±2,3 * *** ●	20,9±3,7	21,2±1,9 * *** ●	14,9±3,3	6,9±0,7 **
Контроль ная	До лечения	75,7±3,3	43,7±1,9	28,2±2,7	15,5±3,2	7,1±0,6	7,1±0,6
	После ПХТ	77,2±2,0	47,1±2,3	26,0±2,3	12,9±1,6	8,8±0,6	8,9±0,9●
Здоровые		75,6±5,2	55,2±2,9	22,0±2,5	14,6±2,6	10,2±2,2	6,0±0,7

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателя до лечения; ** – статистически достоверные отличия от показателя после 1-го курса ДКВ; *** – статистически достоверные отличия от показателей контрольной группы после лечения; ● – статистически достоверные отличия от показателей здоровых женщин (p<0,05)

Как видно из таблицы 1, проведение 1 курса ДКВ у больных основной группы приводит к транзиторному статистически достоверному повышению уровня T regs; остальные показатели состава основных популяций и субпопуляций лимфоцитов остаются без изменений по сравнению с исходными параметрами. Дальнейшее проведение лечения, включающего 4 курса ДКВ, также не вызывает изменений исследованных параметров, хотя в эти сроки уровень T regs возвращается к исходному. Только после 8 и более курсов

развивается выраженная и, на наш взгляд, в целом благоприятная динамика. Так, отмечено статистически значимое повышение уровней лимфоцитов, потенциально обладающих цитотоксичностью, а именно CD3+CD8+ и NK-клеток, причем количество последних возрастает почти в 2 раза. На этом фоне наблюдается снижение процентного содержания CD3+ и CD3+CD4+ клеток, по-видимому, происходящее за счет T regs, имеющих сходный с T-хелперами иммунофенотип. Статистически значимое снижение уровня T regs регистрируется по сравнению с отмеченным после 1-го курса лечения. Подобные изменения, касающиеся CD3+, CD3+CD4+, T regs и NK-клеток, продолжают сохраняться у больных, находящихся в ремиссии после проведенного лечения с включением ДКВ. В эти же сроки (8 и более курсов ДКВ и в период ремиссии) отмечены аналогичные статистически значимые отличия исследованных показателей от данных больных контрольной группы, получавшей ПХТ, в которой изменений исследованных показателей иммунного статуса после лечения не наблюдается. При сравнении с показателями иммунного статуса группы здоровых женщин после окончания лечения в контрольной группе отмечено статистически достоверно более высокое содержание T regs, тогда как у больных после 8–19 курсов ДКВ – перераспределение основных субпопуляций лимфоцитов в сторону CD3+CD8+, а у находящихся в ремиссии – в сторону натуральных киллеров.

В таблице 2 представлена динамика уровней «наивных» Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти у больных, получавших лечение, включающее ДКВ.

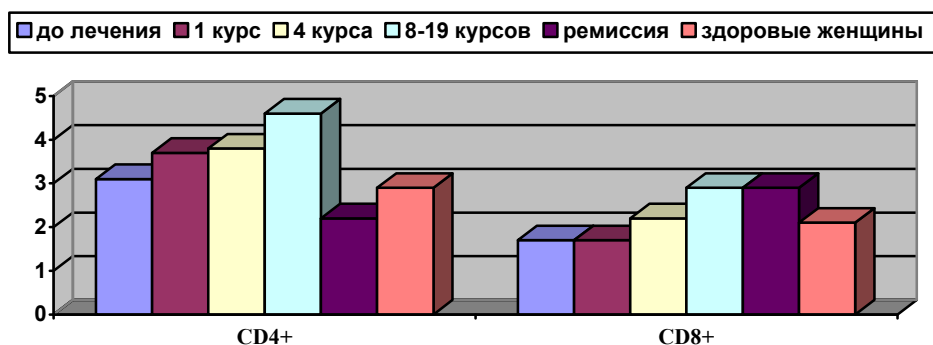
Таблица 2

Динамика показателей иммунного статуса у больных РШМ, получавших лечение, включающее ДКВ (Т-лимфоциты «памяти» и «наивные» Т-лимфоциты)

Сроки исследования	Показатели, %			
	CD3+CD45RO+CD45RA- (Tm)		CD3+CD45RA+CD45RO-CD62L+ (Th0)	
	CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
До начала лечения	51,7±6,3	28,5±2,1	16,8±4,2	17,0±3,6**
1 курс ДКВ	57,1±5,8	29,0±4,7	15,6±3,6	17,1±3,4**
4 курса ДКВ	58,0±7,8	29,1±6,0	15,2±4,1	13,7±2,3**
8–19 курсов ДКВ	69,7±4,3* **	34,6±7,4	15,0±3,4	11,8±4,8**
Ремиссия	53,2±6,2	40,4±5,3*	24,1±6,8	19,4±5,3
Здоровые	55,0±3,7	35,0±4,3	23,4±3,2	27,7±3,7

Примечание. * – статистически достоверные отличия от показателя до лечения; ** – статистически достоверные отличия от показателя здоровых женщин (p<0,05)

Как видно из представленных в ней данных, проведение 1 и 4 курсов ДКВ не приводит к изменению этих показателей по сравнению с исходными. После 8 и более курсов ДКВ развивается статистически достоверное повышение по сравнению с исходным уровнем хелперно-индукторных Т-клеток с фенотипом Т_m, а при достижении ремиссии – цитотоксических Т_m-клеток. В ремиссии, кроме того, отмечена тенденция к повышению уровней «наивных» Т-лимфоцитов обеих основных субпопуляций, хотя статистически значимых отличий от показателей до лечения и в динамике лечения, включающего вакцинотерапию, не выявлено. Интересным оказалось сравнение полученных данных больных с показателями здоровых женщин: у больных РШМ после проведения 8–19 курсов ДКВ отмечен статистически значимо более высокий уровень Т_m в субпопуляции CD4+ лимфоцитов, а содержание Th0 в субпопуляции CD8+ на протяжении всего срока лечения было ниже, хотя статистически достоверных различий по уровням Т_m CD8+ не получено. Более наглядную картину дает анализ соотношения Т_m/Th0 лимфоцитов в динамике лечения (рисунок).



Динамика соотношения Т_m/Th0 лимфоцитов субпопуляций CD4+ и CD8+ в динамике лечения с применением ДКВ. Ось Y – Т_m/Th0

Как видно из данных, представленных на рисунке, по мере применения курсов ДКВ увеличивается соотношение Т_m/Th0 лимфоцитов в обеих основных субпопуляциях, что говорит о развитии иммунологической памяти и, видимо, является одним из механизмов, обеспечивающих наблюдаемый клинический эффект. Следует отметить, что в ремиссии достигнутое соотношение сохраняется только для CD8+ (цитотоксических) лимфоцитов, которым отводится ведущая роль в противоопухолевой защите.

Заключение. Итак, наиболее выраженные изменения по сравнению с первоначальными показателями клеточного иммунитета отмечены у больных, получавших длительную вакцинотерапию ДКВ (от 8 до 19 курсов). Они связаны с выраженным повышением уровней NK- и CD3+CD8+ лимфоцитов, ответственных за врожденную и

адаптивную цитотоксичность соответственно, а снижение общего уровня CD3+CD4+ лимфоцитов сопровождается повышением доли клеток «памяти» внутри этой субпопуляции. Описанную динамику, а также снижение уровня T regs вполне можно расценить как благоприятную, по всей вероятности, вносящую вклад в развитие ремиссии, при которой часть этих изменений сохраняется. Как известно, T-лимфоциты, обеспечивающие иммунологическую память, играют важную роль при различных хронических заболеваниях и, в частности, участвуют в противоопухолевой защите. Данная субпопуляция гетерогенна, содержит эффекторные (T_{em}) и центральные (T_{cm}) клетки памяти; T_{em} выполняют «сторожевую» функцию, населяя периферические ткани (печень, легкие), а также область воспалительного или опухолевого очага, а T_{cm} обеспечивают защиту на системном уровне и быстрый ответ на последующие введения антигена [13]. Обе эти разновидности имеют также принадлежность к субпопуляциям CD3+CD4+ и CD3+CD8+, причем особое значение придается CD8+ клеткам «памяти»; частота встречаемости лимфоцитов, проявляющих специфическую цитотоксичность против опухолевых антигенов, намного выше среди CD8+ клеток памяти, чем среди наивных [14]. Уровень CD8+ клеток T_m в опухоли при ряде солидных новообразований рассматривается как ключевой фактор общей выживаемости больных [15]. Поэтому повышение их уровня при развитии ремиссии у больных, получавших ДКВ, характеризуется нами как позитивный фактор.

Оценка динамики состояния больных, несмотря на неоднородность группы, позволила заключить, что многократная вакцинация с помощью ДКВ удовлетворительно переносится больными РШМ и при применении в комплексном лечении вызывает клинический эффект. Наблюдения над больными, находящимися в ремиссии, продолжаются.

Список литературы

1. Berzofsky J.A., Terabe M., SangKon Oh., Belyakov I.M., Ahlers J.D., Janik J.E., Morris J.C. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004. vol. 113. No. 11. P. 1515-1523.
2. Markowitz L. E., Hariri S., Lin C., Dunne E.F., Steinau M., Mcquillan G.M., Unger E.R. Reduction in Human Papillomavirus (HPV) Prevalence Among Young Women Following HPV Vaccine Introduction in the United States. *National Health and Nutrition Examination Surveys*. 2003–2010. *JID*. 2013. vol. 208. P. 385-393.
3. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Принципы создания и использования лечебных вакцин в онкологии // *Российский онкологический журнал*. 2010. №4. С.55-60.
4. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews*.

Cancer. April 2012. vol. 12. P. 265-277. DOI:10.1038/nrc3258.

5. Saxena M., Bhardwaj N. Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment. Trends Cancer. Feb 2018. vol. 4. no. 2. P. 119-137. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.12.007.

6. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. Киев: Наукова Думка, 2005. 792 с.

7. Балдуева И.А., Моисеенко В.М., Данилова А.Б., Данилов А.О., Нехаева Т.Л., Георгиев Г.П., Гнучев Н.В., Ларин С.С., Киселёв С.Л. Клеточные технологии в терапии злокачественных опухолей // Росс. иммун. журнал. 2008. Т.2(11), № 2-3. С. 303-304

8. Нехаева Т.Л., Балдуева И.А., Новик А.В., Данилова А.Б., Данилов А.О., Комаров Ю.И., Воробейчиков Е.В., Пономаренко В.М., Вааль А.И. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК) // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7 (16). № 2-3. С. 345

9. Dillman R.O., Cornforth A.N., Nistor G.I., McClay E.F., Amatruda Th.T., Depriest C. Randomized phase II trial of autologous dendritic cell vaccines versus autologous tumor cell vaccines in metastatic melanoma: 5-year follow up and additional analyses. Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2018. no.6. P.19. DOI: 10.1186/s40425-018-0330-1.

10. Ridolfi L., Rosa F., Fiammenghi L., Petrini M., Granato A.M., Ancarani V., Pancisi E., Soldati V., Cassan S., Bulgarelli J., Riccobon A., Gentili G., Nanni O., Framarini M., Tauceri F., Guidoboni M. Complementary vaccination protocol with dendritic cells pulsed with autologous tumour lysate in patients with resected stage III or IV melanoma: protocol for a phase II randomised trial (ACDC Adjuvant Trial). BMJ Open. 2018. no.8:e021701. P. 1-6. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-021701.

11. Водолажский Д.И., Меньшенина А.П., Двадненко К.В., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Бахтин А.В., Моисеенко Т.И., Селютина О.Н., Франциянц Е.М. Опыт конструирования дендритно-клеточной вакцины для лечения рака шейки матки // Фундаментальные исследования. 2015. № 1-4. С. 716-720.

12. Кит О.И., Водолажский Д.И., Франциянц Е.М., Моисеенко Т.И., Меньшенина А.П. Способ лечения первичных больных местно-распространенным раком шейки матки // Патент РФ № 2616531. Патентообладатель ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России. 2017. Бюл. №11.

13. Shin H., Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. Immunol Rev. 2013. vol. 255 no. 1. P. 165-181.

14. Perret R., Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours?. Tissue Antigens. 2008. vol. 72. no. 3. P. 187-194. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2008.01088.x.

15. Hadrup S., Donia M., Straten P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor

Microenvironment. *Cancer Microenviron.* Aug 2013. vol. 6. no. 2. P. 123–133. DOI:
10.1007/s12307-012-0127-6.