

УДК 616:006-089:616.8-089

## ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА НА ФОНЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ УРОВНЯ КРАНИОВЕРТЕБРАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА И ВЕРХНЕШЕЙНОГО ОТДЕЛА ПОЗВОНОЧНИКА

<sup>1</sup>Бажанов С.П., <sup>1</sup>Ульянов В.Ю., <sup>1</sup>Норкин И.А., <sup>1</sup>Щуковский В.В., <sup>2</sup>Гуляев Д.А.

<sup>1</sup>ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава, Саратов, e-mail: v.u.ulyanov@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГБУ «Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: info@rnsi.ru

Целью данного исследования явилось изучение показателей клеточного звена иммунитета у больных со злокачественными опухолями верхнешейного отдела позвоночника и уровня краниовертебрального перехода. Объектом исследования стали 22 больных со злокачественными опухолями области краниовертебрального перехода и верхнешейного отдела позвоночника. Для оценки функционирования иммунной системы применяли методы иммунофенотипирования популяционной и субпопуляционной принадлежности лимфоцитов периферической крови. Показано, что применение средств для коррекции клеточного звена иммунитета приводит к достоверному увеличению T(CD3<sup>+</sup>)-лимфоцитов и T(CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>)-киллеров.

**Ключевые слова:** позвоночник, спинной мозг, злокачественные опухоли, иммунитет

## EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY ON THE BACKGROUND COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH MALIGNANT TUMORS LEVEL CRANIOVERTEBRAL JUNCTION AND UPPER CERVICAL SPINE

<sup>1</sup>Bazhanov S.P., <sup>1</sup>Ulyanov V.Y., <sup>1</sup>Norkin I.A., <sup>1</sup>Schukovskiy V.V., <sup>2</sup>Gulyaev D.A.

<sup>1</sup>Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedic, e-mail: v.u.ulyanov@gmail.com;

<sup>2</sup>Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery of Professor A.L. Polenov, e-mail: info@rnsi.ru

The purpose of this study was to determine parameters of cellular immunity in patients with malignant tumors of the upper cervical spine and craniovertebral junction level. The object of the study were 22 patients with malignant tumors of the craniovertebral junction and upper cervical spine. To assess the function of the immune system have applied the methods of population and subpopulation immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes accessories. Shown that the use of funds for the correction of cell immunity results in significant increase in T(CD3<sup>+</sup>) – lymphocytes and T(CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) – killers.

**Keywords:** spine, spinal cord, malignant tumor, immunity

По данным большинства исследователей отмечено, что одним из основных факторов, приводящих к развитию опухоли, являются различные нарушения со стороны иммунной системы [2, 3, 5]. В этой же связи, при комплексной терапии неопластических процессов большое внимание уделяется коррекции структурно-функциональных нарушений иммунитета и специфической активации противоопухолевых механизмов [1, 4, 8].

Ведущую роль в осуществлении противоопухолевой защиты играют реакции клеточного иммунитета, опосредуемые естественными киллерными клетками (врожденный иммунитет) и антигенспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами (приобретенный иммунитет) [7, 9]. Источниками естественных киллерных клеток могут быть натуральные киллерные клетки, а также CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, которые после активации ИЛ-2 или цитокинами (ИЛ-1, ИФН-γ, ГМ-КСФ) приобретают способность лизировать опухолевые клетки. Действие естественных

киллерных клеток неспецифично и не требует предшествующей сенсibilизации. Рядом авторов установлено, что у больных со злокачественными опухолями отмечается снижение субпопуляций CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, при этом не выявлено какой-либо корреляции между степенью анаплазии опухоли и параметрами иммунологического статуса [1, 2, 7, 8]. У онкологических больных в целом снижена реактивность иммунной системы, причем неадекватность и неэффективность опухоль-специфического иммунного ответа развивается на фоне субкомпенсированного состояния иммунитета, преимущественно за счет Т-клеточного иммунодефицита, который, возможно, является вторичным, так как опухолевые клетки непосредственно обладают иммунодепрессивным действием [5, 6, 9]. Кроме этого, лимфоциты периферической крови проявляют дефекты в экспрессии ИЛ-2 и рецептора ИЛ-2, что обнаруживается после стимуляции *in vitro*. Следовательно, при злокачественных опухолях происходит значительное, по

сравнению с доброкачественными опухолями уменьшение количественного состава Т-клеточных субпопуляций Т-лимфоцитов и угнетение процессов активации. Снижение естественной киллерной активности лимфоцитов связано не только с уменьшением количества этих клеток в крови, но и снижением их способности распознавать и связываться с опухолевыми клетками. Снижение функциональной активности NK-клеток имеет место в послеоперационном периоде, а также при продолженном росте опухоли [8].

**Цель** – изучить состояние клеточного звена иммунитета у больных со злокачественными опухолями уровня краниовертебрального перехода и верхнешейного отдела позвоночника на фоне применения неспецифической противоопухолевой иммунотерапии.

### Материал и методы исследования

Объектом данного исследования стали 22 больных в возрасте 50 лет ( $M \pm 1,96$ ) со злокачественными опухолями области краниовертебрального перехода и верхнешейного отдела позвоночника, находившихся на стационарном лечении в нейрохирургическом отделении ФГБУ «СарНИИТО Минздравоохранения РФ» и отделении хирургии опухолей головного и спинного мозга ФГБУ «РНХИ им. проф. А.Л. Поленова Минздравоохранения РФ» в период с 2010 по 2012 гг.

Критериями включения пациентов в исследование были: возраст больного старше 17 лет; степень компенсации общего состояния пациента по шкале Karnofsky не менее 40 баллов; пациенту в указанный срок наблюдения выполнено хирургическое лечение; диагноз подтвержден гистологически; всем пациентам проведена адьювантная терапия; отсутствие у пациента синхронных и метасинхронных опухолей, а также отдаленных органных метастазов; отсутствие соматической патологии в стадии выраженной клинической декомпенсации, а также психических дисфункций, препятствующих адекватной оценке общего состояния больного.

Всем больным выполняли хирургическое вмешательство, основанное на концепциях единого нейроортопедического и мультидисциплинарного подходов. Гистологический диагноз верифицировали при биопсийном исследовании операционного материала. Распределение больных по гистологическому строению опухолей представлено следующим образом: хордома – 6, хондросаркома – 4, плазмоцитомы – 2, гигантоклеточная опухоль – 2, метастазы рака – 8. Следует отметить, что в случаях метастатического поражения уровня краниовертебрального перехода и верхнешейного отдела позвоночника первичный очаг был верифицирован только у 5 пациентов. Репрезентативность групп обеспечивалась сопоставимостью обследованных лиц по полу и возрасту, уровню и структуре анамнестической заболеваемости, сходностью клинической картины основного заболевания, исходными параметрами лабораторных данных, сопоставимостью по гистологическому диагнозу.

Оценку первичного иммунного статуса проводили перед хирургическим вмешательством (за 2–3 дня) и в динамике на 10–12 день после проведения курса иммунотерапии проводили адьювантную терапию, которая включала цитотоксическую химиотерапию, лучевую терапию, неспецифическую иммунотерапию. Неспецифическая противоопухолевая иммунотерапия в структуре комплексного лечения была проведена 11 больным в течение 14 дней и включала в себя препараты для коррекции клеточного иммунитета (Тактивин и Зимозан). Иммунотропную терапию (дозы, способы и кратность введения) осуществляли в соответствии с инструкцией к применению вышеуказанных средств лечения, при этом приоритет отдавали парентеральным формам введения.

Гематологические исследования включали количественное определение клеток, их морфологические характеристики. Аппаратное исследование крови дополнялось визуальным определением количества лейкоцитов с помощью светового микроскопа в счетной камере Горяева. Морфологическое исследование лейкоцитов проводили в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе с подсчетом лейкоцитарной формулы.

Для оценки параметров клеточного звена иммунитета (общее содержание лимфоцитов, CD3 + (Т-лимфоциты), CD3 + CD16 + CD56 + (TNK – клетки), CD4 + (хелперы), CD3 + CD8 + (киллеры), CD3 – CD8 + (активированные NK – клетки), соотношение CD4/CD8, CD3 – CD16 + (NK – клетки), CD19 + (В – лимфоциты), CD 25 + (рецептор ИЛ-2), HLA-DR +, CD95 + (Fas-рецептор)) применялись методы выявления популяционной и субпопуляционной принадлежности лимфоцитов периферической крови, которые выявляли методом иммунофенотипирования (микролимфоцитотоксического теста). Все показатели в целях большей объективизации данных представлялись в абсолютных и относительных величинах.

### Результаты исследований и их обсуждение

В целях объективности исследования при оценке иммунологических параметров мы сочли целесообразным разделить больных на две группы в зависимости от проводимой схемы адьювантной терапии.

1 группа – больные ( $n = 11$ ), получившие комплексное лечение, включающее хирургию, химиотерапию либо лучевую терапию, неспецифическую противоопухолевую иммунотерапию

2 группа – больные ( $n = 11$ ), получившие комплексное лечение, включающее хирургию химиотерапию либо лучевую терапию. Неспецифическая противоопухолевая иммунотерапия в этой группе не проводилась.

Для большей объективизации материалов и их корректной оценки исследуемые показатели клеточного звена иммунитета для двух групп больных представлены как в абсолютных, так и в относительных значениях.

Таблица 1

Динамика показателей клеточного иммунитета в процессе комплексного лечения у больных первой группы (абсолютные значения),  $n = 11$

Показатели клеточного иммунитета	$M \pm m$ (до лечения)	$M \pm m$ (после лечения)
Лейкоциты ( $10^9/\text{л}$ )*	$5,63 \pm 1,19$	$10,58 \pm 1,23$
Лимфоциты*	$1030,01 \pm 204,77$	$1376 \pm 284,88$
T(CD3 +)-лимфоциты *	$878,7 \pm 134,85$	$1572,4 \pm 690,66$
CD3 + CD(16 + 56) + (ТНК-клетки)	$95,2 \pm 25,58$	$87,8 \pm 24$
CD3 + CD4 + (Т-хелперы)	$503,8 \pm 92,35$	$489,5 \pm 102,81$
CD3 + CD8 + (Т-киллеры)*	$252,9 \pm 33,7$	$347,8 \pm 117,17$
CD3-CD8 + (активированные NK-клетки)	$35,5 \pm 6,32$	$35,8 \pm 10,24$
Соотношение CD4/CD8	$2,1 \pm 0,22$	$2,59 \pm 0,49$
CD3-CD(16 + 56) + (NK-клетки)	$82,1 \pm 17,83$	$71,8 \pm 19,71$
CD19 +	$213,2 \pm 51,58$	$255,1 \pm 61,48$
CD25 + (Рецептор ИЛ-2)	$115,2 \pm 22,65$	$94,4 \pm 32,2$
HLADR	$351,2 \pm 63,98$	$296,8 \pm 74,28$
CD95 +	$42,6 \pm 10,45$	$77,2 \pm 30,47$

Примечание: \*  $p \leq 0,05$ .

Из табл. 1 следует, что при оценке абсолютных показателей клеточного звена иммунитета у больных в первой изучаемой

группе отмечали увеличение T(CD3 +)-лимфоцитов и T(CD3 + CD8 +)-киллеров после проведения лечения.

Таблица 2

Динамика показателей клеточного иммунитета в процессе комплексного лечения у больных первой группы (относительные значения),  $n = 11$

Показатели клеточного иммунитета	$M \pm m$ (до лечения)	$M \pm m$ (после лечения)
Лейкоциты ( $10^9/\text{л}$ )	$8,27 \pm 1,28$	$5,76 \pm 0,6$
Лимфоциты	$22,95 \pm 2,83$	$19,79 \pm 2,75$
T(CD3 +)-лимфоциты*	$78,36 \pm 2,81$	$85,82 \pm 2,28$
CD3 + CD(16 + 56) + (ТНК-клетки)	$3,57 \pm 0,89$	$5,48 \pm 0,78$
CD3 + CD4 + (Т-хелперы)	$44,64 \pm 3,16$	$46,09 \pm 3,95$
CD3 + CD8 + (Т-киллеры)*	$28,36 \pm 2,5$	$34,09 \pm 4,14$
CD3-CD8 + (активированные NK-клетки)	$3,38 \pm 0,77$	$2,69 \pm 0,56$
Соотношение CD4/CD8	$1,82 \pm 0,32$	$1,84 \pm 0,39$
CD3-CD(16 + 56) + (NK-клетки)	$10,42 \pm 1,96$	$7,44 \pm 1,39$
CD19 +	$8,35 \pm 1,62$	$6,65 \pm 1,14$
CD25 + (Рецептор ИЛ-2)	$12,18 \pm 1,43$	$10,54 \pm 1,55$
HLADR	$20,09 \pm 1,47$	$21,82 \pm 3,44$
CD95 +	$5,45 \pm 1,38$	$5,73 \pm 1,32$

Примечание: \*  $p \leq 0,05$ .

Из табл. 2 видно, что при оценке относительных показателей клеточного звена иммунитета у больных в первой изучаемой группе

также отмечали увеличение T(CD3 +)-лимфоцитов и T(CD3 + CD8 +)-киллеров после проведения лечения.

**Таблица 3**

Динамика показателей клеточного иммунитета в процессе комплексного лечения у больных второй группы (абсолютные значения),  $n = 11$

Показатели клеточного иммунитета	М ± m (до лечения)	М ± m (после лечения)
Лейкоциты ( $10^9/л$ )	8,27 ± 1,28	6,75 ± 0,6
Лимфоциты	22,93 ± 2,83	21,69 ± 2,75
T(CD3 +)-лимфоциты	1192 ± 123,07	1181 ± 165,6
CD3 + CD(16 + 56) + (ТНК-клетки)	78,72 ± 27,47	78,08 ± 15,61
CD3 + CD4 + (Т-хелперы)	672,45 ± 69,19	648 ± 85,44
CD3 + CD8 + (Т-киллеры)*	495,82 ± 85,43	481,82 ± 102,24
CD3-CD8 + (активированные НК-клетки)	51,34 ± 12,56	37,28 ± 8,96
Соотношение CD4/CD8	1,82 ± 0,32	1,83 ± 0,37
CD3-CD(16 + 56) + (НК-клетки)	174,09 ± 46	102,27 ± 23,29
CD19 +	121,64 ± 31,63	92,55 ± 25,12
CD25 + (Рецептор ИЛ-2)	187,18 ± 25,68	137,73 ± 22,18
HLADR	287,18 ± 34,65	315,82 ± 69,23
CD95 +	87,71 ± 32	75,17 ± 22,01

Примечание: \*  $p \leq 0,05$ .

Из табл. 3 следует, что при оценке абсолютных показателей клеточного звена иммунитета у больных во второй изучаемой группе

уровень T(CD3 +)-лимфоцитов достоверно не изменялся, уровень T(CD3 + CD8 +)-киллеров уменьшался после проведения лечения.

**Таблица 4**

Динамика показателей клеточного иммунитета в процессе комплексного лечения у больных второй группы (относительные значения),  $n = 11$

Показатели клеточного иммунитета	М ± m (до лечения)	М ± m (после лечения)
Лейкоциты ( $10^9/л$ )	8,57 ± 1,21	6,75 ± 1,17
Лимфоциты	18,31 ± 2,44	13,17 ± 2,74
T(CD3 +)	70,2 ± 3,21	70,7 ± 2,75
CD3 + CD(16 + 56) + (ТНК-клетки)	6,13 ± 1,18	5,73 ± 0,78
CD3 + CD4 + (Т-хелперы)	49,2 ± 3,46	43,7 ± 4,5
CD3 + CD8 + (Т-киллеры)	25,1 ± 2,16	21,7 ± 1,87
CD3-CD8 + (активированные НК-клетки)	2,87 ± 0,64	2,57 ± 0,59
Соотношение CD4/CD8	2,1 ± 0,23	2,57 ± 0,48
CD3-CD(16 + 56) + (НК-клетки)	6,9 ± 1,53	6,5 ± 1,37
CD19 +	17,7 ± 3,03	23,1 ± 2,7
CD25 + (Рецептор ИЛ-2)	8,53 ± 1,42	8,93 ± 1,32
HLADR	28,6 ± 3,52	25,3 ± 3,4
CD95 +	5,1 ± 0,85	7,4 ± 1,95

Примечание: \*  $p \leq 0,05$ .

Из табл. 4 следует, что уровень T(CD3 +)-лимфоцитов во второй изучаемой группе достоверно не изменялся, а уровень T(CD3 + CD8 +)-киллеров после проведения лечения уменьшался.

Представленный материал свидетельствует, что включение в схему комплексно-

го лечения средств неспецифической противоопухолевой иммунотерапии у больных со злокачественными опухолями уровня краниовертебрального перехода и верхнешейного отдела позвоночника позволяет сохранить или повысить потенциал клеточных механизмов иммунной защиты, игра-

ющих ведущую роль в распознавании мутировавших клеток, а также дезинтеграции и элиминации генетически чужеродного материала.

Зачастую комплексное лечение злокачественных опухолей вследствие применения таких «жестких» методов, как химиотерапия и лучевая терапия, способствует выраженному угнетению иммунной защиты. Данное исследование показывает, что применение иммунотерапии наряду с другими методами послеоперационного лечения пациентов с опухолевыми процессами приводит к сохранению структурно-количественных и функциональных параметров большинства элементов иммунной системы. Используемые препараты (Тактивин, Зимозан) обладают противоопухолевым действием: восстанавливают функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную продуктами метаболизма опухолевых клеток, усиливают иммунокорректирующий и иммуностимулирующий эффекты. Иммунокоррекция позволила снизить количество осложнений, связанных с послеоперационной иммунодепрессией и химиотерапией.

#### Заключение

Включение в комплексную терапию пациентов со злокачественными новообразованиями верхнешейного отдела позвоночника и уровня краниовертебрального перехода средств неспецифической иммуностропной терапии позволяет демпфировать негативные влияния на иммунную систему химиотерапии и лучевой терапии и тем самым сохранять на достаточно высоком уровне активность клеточных механизмов противоопухолевой защиты.

#### Список литературы

1. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцино-терапии рака // Вестн. Рос. АМН. – 2004. – № 12. – С. 6–10.
2. Бажанов С.П., Ульянов В.Ю. Оценка параметров клеточного иммунитета у больных с анапластическими менигиомами верхнешейного отдела позвоночника и уровня краниовертебрального перехода // Новые медицинские технологии. – URL: <http://econf.rae.ru/article/6560> (дата обращения: 09.07.2012).
3. Гранов А.М. Канцерогенез и иммунология опухоли. Фундаментальные и клинические аспекты / А.М. Гранов, О.Е. Молчанов // Вопр. онкол. – 2008 – Т. 54, № 4. – С. 401–409.
4. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М.: МИА, 2003. – 603 с.
5. Иммунодефицитные состояния / под ред. В.С. Смирнов, И.С. Фрейдлин. – СПб.: Фолиант, 2000. – 568 с.

6. Рабсон А. Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А., Ройт, П., Делвз. – М.: Мир, 2006. – 320 с.

7. Cooper M.A. The biology of human natural killer-cell subsets / M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri // Trends immunol. – 2001. – Vol. 22, № 11. – P. 633–640.

8. Lillehei K.O. Immunotherapy // Neuro – Oncology Essentials / Ed. by S. Mark Bernstein & Mitchel. – Berger: Thieme Medical Publishers, Inc; New York, 2000. – P. 264–272.

9. Whiteside T.L. Human tumor antigen-specific T-lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparisons of antitumor effects in vitro and in vivo / T.L. Whiteside, M.W. Sung, S. Nagashima et al. // Clin cancer res. – 1998. – Vol. 4. – P. 1135–1145.

#### References

1. Baryshnikov A.Ju. Principy i praktika vakcinoterapii raka. A.Ju. Baryshnikov. Vestn. Ros. AMN. 2004. no. 12. pp. 6–10.
2. Bazhanov S.P., Ul'janov V.Ju. Ocenka parametrov kletocznego immuniteta u bol'nyh s anaplasticheskimy meningiomamy verhneshajego otdela pozvonochnika i urovnja kraniovertebral'nogo perehoda. Novye medicinskie tehnologii. URL: <http://econf.rae.ru/article.6560> (data obravnenija: 09.07.2012).
3. Granov A.M. Kancerogenez i immunologija opuholi. Fundamental'nye i klinicheskie aspekty. A.M. Granov, O.E. Molchanov. Vopr. onkol. 2008. no. 4. pp. 401–409.
4. Drannik G.N. Klinicheskaja immunologija i allergologija. G.N. Drannik. M.:MIA, 2003. 603 p.
5. Immunodeficitnye sostojanija. Red. V.S. Smirnov, I.S. Frejdlin. SPb.: Foliant, 2000. 568 p.
6. Rabson A. Osnovy medicinskoj immunologii. A. Rabson, A. Rojt, P., Delvz. M.: Mir, 2006. 320 p.
7. Cooper M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri. Trends immunol. 2001. Vol. 22, no. 11. p. 633–640.
8. Lillehei K.O. Immunotherapy K.O. Lillehei. Neuro – Oncology Essentials. Ed. by S. Mark Bernstein & Mitchel. Berger: Thieme Medical Publishers, Inc; New York, 2000. p. 264–272.
9. Whiteside T.L. Human tumor antigen-specific T-lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparisons of antitumor effects in vitro and in vivo. T.L. Whiteside, M.W. Sung, S. Nagashima et al. Clin cancer res. 1998. Vol. 4. pp. 1135–1145.

#### Рецензенты:

Шевченко В.П., д.м.н., профессор, руководитель отделения анестезиологии и реаниматологии ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения и социального развития России», г. Новосибирск;

Попов А.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии с трансфузиологией ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития России», г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 28.01.2013.