На правах рукописи

Шаталов Илья Дмитриевич

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ РАКЕ ГОРТАНИ И ПРИМЕНЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА

14.03.02 – патологическая анатомия

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Надеев Александр Петрович**

доктор медицинских наук, профессор **Киселев Алексей Борисович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Казачков Евгений Леонидович**
(Челябинская государственная медицинская академия, заведующий кафедрой патологической анатомии)

доктор медицинских наук, профессор **Цырендоржиев Дондок Дамдинович**
(Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологии стволовой клетки)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской федерации (г. Барнаул)

Защита состоится «_____»_____2012 г. в «_____» на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; тел. (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан «___»_____2012г.

Ученый секретарь диссертационного совета А.В.Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Глобальный устойчивый рост заболеваемости и смертности населения стран мира от злокачественных опухолей и связанные с этим значительные социально-экономические потери позволяют рассматривать противораковую борьбу как одну из наиболее актуальных проблем здравоохранения [Антонив В.Ф., 2002; Хрусталева Е.В., 2002; Ольшанский В.О., 2008]. В Российской Федерации рак гортани в структуре онкологической патологии по частоте встречаемости занимает пятое место, более 65 % больных раком гортани – лица трудоспособного возраста [Алферов В.С.,1993; Ольшанский В.О., 2008].

Поиск новых способов лечения злокачественных опухолей основывается, в том числе, и на изучении механизмов противоопухолевого иммунитета. Известно, что растущая опухоль вырабатывает антигены, вызывающие противоопухолевый иммунный ответ. Главную роль в клеточном противоопухолевом иммунитете играют цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные клетки киллеры (NK-клетки) и макрофаги. Гуморальные механизмы участвуют в разрушении злокачественных клеток посредством двух систем: активации комплемента и индукции реакций антителозависимой клеточной цитотоксичности NK-клетками [Пушкарь И.С. и соавт., 2010; Кухарев Я.В., 2010; Felten S.Y., Felten D.L.,1991; Hannestad J., DellaGioia N., Bloch M., 2011].

Согласно современным представлениям, накопление в строме опухоли Т- и В-лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов, обусловленное специфическими антигенами, является морфологическим выражением местного противоопухолевого иммунитета [Лапшина Т.А. и соавт., 2010; Кухарев Я.В. и соавт., 2010].

Нарушение баланса цитокиновой сети играет ведущую роль в механизмах канцерогенеза [Бережная Н.М., 1988, 2000; Thomas L. et al., 2011]. С участием интерлейкинов происходят распознавание опухолевых антигенов, активация антигенпрезентирующих клеток, миграция иммунокомпетентных клеток к участку развития опухоли, генерация практически всех клонов цитотоксических клеток, индукция апоптоза опухолевых клеток и другие

процессы [Фильченков А.А., 1998; Romangani S., 1994; Kaptoge S., Di Angelantonio E., 2010]. К группе интерлейкинов, которые являются основными индукторами цитотоксической активности различных киллерных клеток, относят интерлейкин-2 (IL-2). При различных злокачественных новообразованиях у человека определяется снижение синтеза IL-2 лимфоцитами периферической крови (на 2-4 стадиях опухолевого процесса), что коррелирует со снижением активности киллерных клеток [Горецкий Б.А. и соавт., 1989; Бережная Н.М., Горецкий Б.А., 1992; De Vita F. et al., 1991; Elg S.A. et al., 1997; Sadri M, McMahon J., Parker A., 2006].

При опухолевых процессах большое внимание уделяется также роли провоспалительного цитокина интерлейкина-6 (IL-6) [Thiounn N. et al., 1997]. Интерлейкин-6 обладает способностью оказывать влияние на процессы дифференцировки В-лимфоцитов, повышение уровня синтеза антител, индуцирует цитотоксичность клеток и их ответ на IL-2; IL-6, являясь провоспалительным цитокином, обладает способностью модулировать противоопухолевую активность макрофагов [Бережная Н.М., 1988; Galdy C. et al., 1995; Krautwald S., 1998; Islami F., Tramacere I., 2010].

Цель исследования. Изучить патоморфологические проявления местного и системного противоопухолевого иммунного ответа при местнораспространенных формах рака гортани ($T_{1-4}N_0M_0$) и при применении рекомбинантного интерлейкина-2 человека.

Задачи исследования

1. Изучить гистологические типы и особенности клеточного состава воспалительного инфильтрата в строме опухолевого узла местнораспространенного рака гортани ($T_{1-4}N_0M_0$) при использовании рекомбинантного интерлейкина-2 человека.

2. Изучить интенсивность клеточного воспалительного инфильтрата в строме опухолевого узла местнораспространенного рака гортани ($T_{1-4}N_0M_0$) при использовании рекомбинантного интерлейкина-2 человека.

3. Исследовать влияние рекомбинантного IL-2 на фагоцитарное и лимфоцитарное звено Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа при раке гортани ($T_{1-4}N_0M_0$).

4. Исследовать концентрацию IL-6 у пациентов с местнораспространенной формой рака гортани ($T_{1-4}N_0M_0$) при использовании рекомбинантного IL-2.

Научная новизна. Впервые показано усиление стромальной лимфоцито-плазмоцитарной инфильтрации в раковой опухоли гортани ($T_{1-3}N_0M_0$) при применении рекомбинантного IL-2 человека.

Впервые продемонстрировано, что воздействие рекомбинантного IL-2 человека вызывает изменение Т-клеточного противоопухолевого иммунитета при раке гортани ($T_{1-3}N_0M_0$): в лимфоцитарном звене – увеличение количества CD8-лимфоцитов, В-лимфоцитов, клеток естественных киллеров периферической крови до оперативного лечения; фагоцитарном звене – увеличение нейтрофильной активности до оперативного лечения, с нормализацией исследованных показателей к 6 месяцу после оперативного вмешательства.

При применении рекомбинантного IL-2 человека при раке гортани ($T_{1-4}N_0M_0$) наблюдается снижение концентрации IL-6 в плазме крови, что способствует уменьшению развития воспалительных осложнений в послеоперационном периоде.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета в разделе «Общие вопросы опухолевого роста».

Включение в морфологический анализ опухолевого узла рака гортани, описания клеточной стромальной лимфоцитарно-плазмоцитарной инфильтрации внедрено в практику патологоанатомического отделения Городской клинической больницы № 1 (г. Новосибирск).

Уточнение клеточной реакции стромы раковой опухоли гортани и системной лимфоцитарной реакции в ответ на селективную активацию Т-клеточного противоопухолевого иммунитета рекомбинантным IL-2 человека позволяет обосновать введение IL-2 цитокинотерапии больным местно распространенным раком гортани $T_{1-3}N_0M_0$. На основании полученных данных, селективная активация Т-клеточного противоопухолевого иммунитета

рекомбинантным IL-2 человека введена в практику предоперационной подготовки больных раком гортани $T_{1-3}N_0M_0$ в оториноларингологическом отделении Городской клинической больницы № 1 (г. Новосибирск).

Положения, выносимые на защиту

1. Использование рекомбинантного IL-2 человека при раке гортани T_1-$_3N_0M_0$ усиливает стромальную лимфоцитарно-плазмоцитарную инфильтрацию опухолевого узла.

2. Интенсивность клеточной лимфоцитарно-плазмоцитарной инфильтрации в строме опухоли при использовании рекомбинантного IL-2 человека является критерием выраженного местного противоопухолевого иммунного ответа.

3. Применение при раке гортани рекомбинантного IL-2 человека модулирует системный противоопухолевый иммунный ответ.

Апробация материалов диссертации. Результаты работы доложены и обсуждены на Ежегодной конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2009» (Новосибирск, 2009), на V Региональной конференции молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2010), на заседании Новосибирского научного общества оториноларингологов, Межрегиональной научно-практической конференция оториноларингологов «Основные направления оториноларингологии» (Барнаул, 2010), на Юбилейной межрегиональной научно-практической конференции оториноларингологов, посвященной 75-летию Новосибирского государственного медицинского университета и кафедры оториноларингологии (Новосибирск, 2010).

Внедрение. Результаты исследования внедрены в работу патологоанатомического отделения Городской клинической больницы № 1 (г. Новосибирск), в учебный процесс Новосибирского государственного медицинского университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 3 – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России для публикаций основных результатов исследования.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на

115 страницах машинопиного текста, иллюстрирована рисунками (30) и таблицами (15). Работа состоит из введения, обзора литературы, главы о материалах и методах исследования, глав, представляющих результаты собственных исследований и обсуждение результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 178 литературных источников, из них 132 отечественных и 46 зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Весь материал собран, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено с разрешения этического комитета Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 14 от 21.05.2010 г.). Морфологическое исследование образцов опухоли проведено на кафедре патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета (зав. кафедрой – д-р мед. наук, академик РАМН В.А. Шкурупий). Иммунологическое исследование проведено в иммунологической лаборатории Государственного Новосибирского областного клинического диагностического центра (зав. лабораторией – Т.В. Климова). Оперативное лечение рака гортани проводилось в оториноларингологическом отделении Городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска (зав. отделением – д-р мед. наук, проф. А.Б. Киселев).

Объект исследования: образцы рака гортани ($T_{1\text{-}4}N_0M_0$) от 65 мужчин после оперативного лечения в возрасте 65,9 ± 4,7 лет. Больные раком гортани были разделены на две группы: 1-я группа контроля 28 человек (56,9 %) и 2-я группа исследования 37 человек (43,1 %). Больные 1-й группы контроля иммунотерапии не получали. Пациенты 2-й группы исследования получали курс иммуностимуляции препаратом Ронколейкин (интерлейкин-2 человека рекомбинантный) по схеме: до оперативного лечения 1,25 мг подкожно. Пациенты каждой группы были разделены на подгруппы соответственно стадиям опухолевого процесса (табл. 1).

Для светооптического исследования образцы рака гортани фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. На санном микротоме

готовили парафиновые серийные срезы толщиной 5-6 мкм [Перов Ю.Л., Саркисов Д.С, 1996]. После депарафинизации их окрашивали гематоксилином Майера, эозином, пиронином и изучали под микроскопом Axio Star (Carl Zeiss, Германия).

Таблица 1

Распределение больных раком гортани в зависимости от стадии опухолевого роста и возраста

Группы	Подгруппы					
	№1 T_{1-2} N_0 M_0		№2 T_3 N_0 M_0		№3 T_4 N_0 M_0	
	количество объектов исследования	средний возраст пациентов	количество объектов исследования	средний возраст пациентов	количество объектов исследования	средний возраст пациентов
1-я (контрольная) группа	12 (43 %)	55,42±4,23	10 (36 %)	61,0±3,69	6 (21 %)	65,17±2,71
2-я группа (исследования)	12 (33 %)	54,58±3,51	15 (40 %)	63,0±3,96	10 (2 %)	62,0±4,83

Определяли гистологические типы рака гортани: альвеолярный, акантотический, трабекулярный, солидный, скиррозный (Классификация ВОЗ, 2005).

Исследовали клеточный состав воспалительного инфильтрата. По преобладанию определенного типа воспалительных клеток выделяли лимфоцитарный, плазмоцитарный, смешанный (лимфоцитарно-плазмоцитарный) инфильтрат.

Изучали интенсивность клеточной реакции стромы, которая была оценена по P. Paavolainen (1970): 1 степень (сильная) – наличие густого инфильтрата из лимфоцитов и плазматических клеток в строме и окружности опухоли во всех секторах опухоли; 2 степень (умеренная) – наличие интенсивной очаговой или умеренной диффузной клеточной инфильтрации; 3 степень (слабая) – умеренная очаговая или слабая диффузная клеточная инфильтрация; 4 степень (отсутствует) – клеточной инфильтрации в строме не выявлено.

Для сравнения иммунологического статуса проводилось иммунологическое исследование здоровых 25 мужчин возраста 65,9 ± 4,7 лет

(2-я контрольная группа).

Иммунологическое исследование включало: CD-типирование клеток периферической крови, проводилось на тест системе «Сорбент» (Россия) с использованием стандартного набора моноклональных и поликлональных антител: Т-лимфоцитов – CD 8, В-лимфоцитов – CD 20, лимфоцитов – натуральных киллеров – CD 16, CD 56 (ЗАО «Вектор-Бэст», Новосибирск). Определение функциональной активности нейтрофилов: в лунку планшета вносили 100 мкл гепаринизированной крови и 50 мкл зимозана, тщательно перемешивая, выдерживали в термостате в течение 40 мин при 37 °С. Из капли крови готовили мазок, окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчитывали фагоцитарный индекс: на 100 нейтрофилов – количество фагоцитировавших нейтрофилов. Определение микробицидной активности нейтрофилов проводился с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). По 0,05 мл гепаринизированной крови вносили в две лунки планшета. В одну лунку добавляли 0,02 мл раствор Хэнкса и 0,02 мл 0,2 % раствора нитросинего тетразолия («спонтанный НСТ-тест»), в другую – 0,02 мл 0,02 % раствора НСТ и 0,02 мл 0,01 % раствора зимозана в качестве стимулятора («индуцированный НСТ-тест»). Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, делали толстые мазки на предметных стеклах. Мазки фиксировали в метиловом спирте в течение 3 мин. Ядра клеток окрашивали кармином при 37 °С в течение 30 мин. В мазке под увеличением х1000 подсчитывали число нейтрофилов (Нф), содержащих включения восстановленного НСТ-диформазана. Всего считали 200 сегментоядерных и палочкоядерных Нф, результат выражали в проценте диформазан-позитивных Нф. Коэффициент функционально метаболической активности (КФМА) определен отношением спонтанного НСТ-теста к индуцированному НСТ-тесту.

Определение концентрации интерлейкина-6 выполнялись на тест-системах ProCon IL-6 (ООО «Протеиновый контур», С.-Петербург). Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре Multiskan MCC 340 («Labsystems Oy», Финляндия) при длине волны 492 нм.

Иммунологические пробы проводились до оперативного лечения, на 15, 30 сутки и через 6 месяцев после введения рекомбинантного IL-2 человека.

Обработка статистической информации проводилась на базе персонального компьютера Pentium-IV. Все собранные в ходе исследования сведения были размещены в электронных таблицах MS Excel 2000.

Вариационные ряды для каждого признака подвергались изучению характера распределения. Проверка распределения на нормальность проводилась с использованием тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. В случае обнаружения нормального закона в распределении значений признака перед сравнением средних показателей выполнялась проверка равенства дисперсий в выборочных совокупностях, для чего вычислялся критерий Левена [Медик В.А., 2001].

При выявлении различий средних величин двух групп вычислялся критерий Стьюдента (t), критерий хи-квадрат (χ^2). В случае, если при вычислении критерия хи-квадрат среди ожидаемых чисел оказывались значения меньше 5, для определения достоверности различий использовался точный критерий Фишера. При сравнении параметрических показателей до и после лечения использовался Т-тест для парных значений; непараметрических – критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая структура рака гортани у пациентов обеих групп была представлена плоскоклеточным раком различной степени дифференцировки. Плоскоклеточный рак (92,3 %): ороговевающий рак – 31 (47,7 %), неороговеваюший рак – 29 (44,6 %), рак из папилломы – 3 (4,4 %), преинвазивный рак (in situ) – 2 (3,3 %).

У пациентов 1-й контрольной группы в 1-й подгруппе ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) наблюдали высокую степень дифференцировки рака гортани в 11 случаях (91,7 %) и во 2-й группе исследования в 1-й подгруппе ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) – в 9 случаях (75 %). Гистологические типы рака гортани были представлены альвеолярным – 9 пациентов (75 %), акантотическим – 3 пациента (25 %) типами строения. У пациентов в 1-й (контрольной) группе 1-й подгруппе ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) лимфоцитарная инфильтрация была определена в 4 случаях (33,3 %), лимфо-плазмоцитарная – в 4 случаях (33,3 %), плазмоцитарная – в 2 случаях (16,7 %); в 2 случаях (16,7 %) клеточная инфильтрация в строме отсутствовала.

У больных во 2-й группе (исследования) 1-й подгруппе ($T_{1-2}N_0M_0$) лимфоцитарная инфильтрация была обнаружена у 6 пациентов (50 %), лимфо-плазмоцитарная – у 3 пациентов (25 %), плазмоцитарная – у 3 пациентов (25 %).

У пациентов в 1-й подгруппе рака гортани (T_{1-2} N_0 M_0) 2-й группы (исследования), получивших цитокинотерапию, в 50 % наблюдений выявлен лимфоцитарный характер клеточной инфильтрации стромы. Пациенты с отсутствием клеточной реакции стромы не выявлены.

Интенсивность клеточной реакции стромы опухоли у больных 1-й (контрольной) группы 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) была оценена как сильная у 3 больных (25 %), как умеренная – у 3 больных (25 %), слабая – у 4 больных (33,3 %). Интенсивность клеточной реакции стромы опухоли во 2-й группе (исследования) 1-й подгруппе ($T_{1-2}N_0M_0$) была оценена как сильная у 6 больных (50 %) и как умеренная – у 6 больных (50 %). Гистологический тип опухоли был представлен альвеолярным у 8 пациентов (66,7 %), акантотическим у 4 пациентов (33,3 %) типом строения.

У пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) после цитокинотерапии наблюдали более интенсивную клеточную инфильтрацию стромы опухоли, которая носила преимущественно лимфоцитарный характер, что морфологически демонстрировало усиление местного противоопухолевого иммунитета.

У пациентов 1-й (контрольной) группы 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) смешанная лимфо-плазмоцитарная инфильтрация была определена в 4 случаях (40 %), лимфоцитарная – в 2 случаях (20 %), плазмоцитарная – в 2 случаях (20 %), отсутствие клеточной реакции стромы определено у 2 пациентов (20 %). Во 2-й группе (исследования) 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) в 53,3 % наблюдений (8 пациентов) выявили лимфоцитарную клеточную инфильтрацию стромы, плазмоцитарную – в 4 случаях (26,7 %), смешанную лимфо-плазмоцитарную – у 3 пациентов (20 %).

Интенсивность клеточной инфильтрации стромы у пациентов 1-й (контрольной) группы 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) была оценена как умеренная в 4 случаях (40 %), как сильная в 2 случаях (20 %), слабая – у 2 пациентов (20 %), отсутствовала – у 2 пациентов (20 %). Гистологический тип опухоли был

представлен альвеолярным типом у 3 пациентов (30 %), акантотическим – у 4 пациентов (40 %), трабекулярным – у 3 пациентов (30 %). Интенсивность клеточной инфильтрации стромы во 2-й группе исследования 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) оценена как сильная (1 степень) у 7 пациентов (46,6 %) и как умеренная (2 степень) у 6 пациентов (40 %), слабая (3 степень) – у 2 пациентов (13,3 %). Гистологические типы рака гортани были представлены: альвеолярным – 7 пациентов (46,7 %), акантотическим – 5 пациентов (33,3 %), трабекулярным – 3 пациентов (20 %).

Морфологическое исследование образцов опухоли рака гортани в 1-й (контрольной) группе 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$) выявило смешанную (лимфо-плазмоцитарную) инфильтрацию во всех 6 случаях (100 %). Гистологический тип опухоли был представлен альвеолярным типом у 1 пациента (16 %), акантотическим – у 2 пациентов (34 %), трабекулярным – у 3 пациентов (50 %). Во 2-й группе исследования 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$) в 9 случаях выявлена смешанная (лимфо-плазмоцитарная) инфильтрация (90 %), в 1-м случае выявлен лимфоцитарный характер клеточной реакции стромы опухоли (10 %). Интенсивность клеточной реакции стромы у пациентов 1-й (контрольной) группы 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) была оценена как умеренная в 4 случаях (67 %), как сильная в 2 случаях (33 %). Интенсивность клеточной реакции стромы во 2-й группе (исследования) 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$) была оценена как умеренная у 6 пациентов (60 %) и как сильная у 4 пациентов (40 %). Гистологический тип опухоли был представлен альвеолярным типом у 3 пациентов (30 %), акантотическим – у 4 пациентов (40 %), трабекулярным – у 3 пациентов (30 %).

Согласно полученным данным, можно заключить, что после цитокинотерапии у пациентов с раком гортани 2-й группы (исследования) в 1-й подгруппе ($T_{1-2}N_0M_0$) и во 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) наблюдалась более интенсивная клеточная инфильтрация стромы опухоли (1-я степень – 50 % и 2-я степень – 50 %), которая носила в 100 % лимфоцитарный характер. Таким образом, цитокинотерапия способствовала усилению местного противоопухолевого иммунитета, которое выражалось в повышении интенсивности клеточной реакции стромы и увеличении количества

лимфоцитов в составе клеточного инфильтрата.

У больных 2-ой группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) до оперативного лечения количество CD 20-лимфоцитов было большим на 34 %, NK-клеток на 19 % в сравнении с величинами аналогичных показателей у больных в 1-й (контрольной) группе 1-й подгруппе ($T_{1-2}N_0M_0$); количество показателей CD 8-лимфоцитов было большим в сравнении с таковыми показателями у здоровых лиц на 24 %, CD 20-лимфоцитов – на 34 %, NK-клеток – на 67 %. У пациентов 2-й контрольной группы 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) количество CD 8-лимфоцитов было большим в сравнении с таковыми показателями у здоровых лиц на 30 %, CD 20-лимфоцитов – в 2,3 раза, NK-клеток – в 3,6 раза (рис. 1).

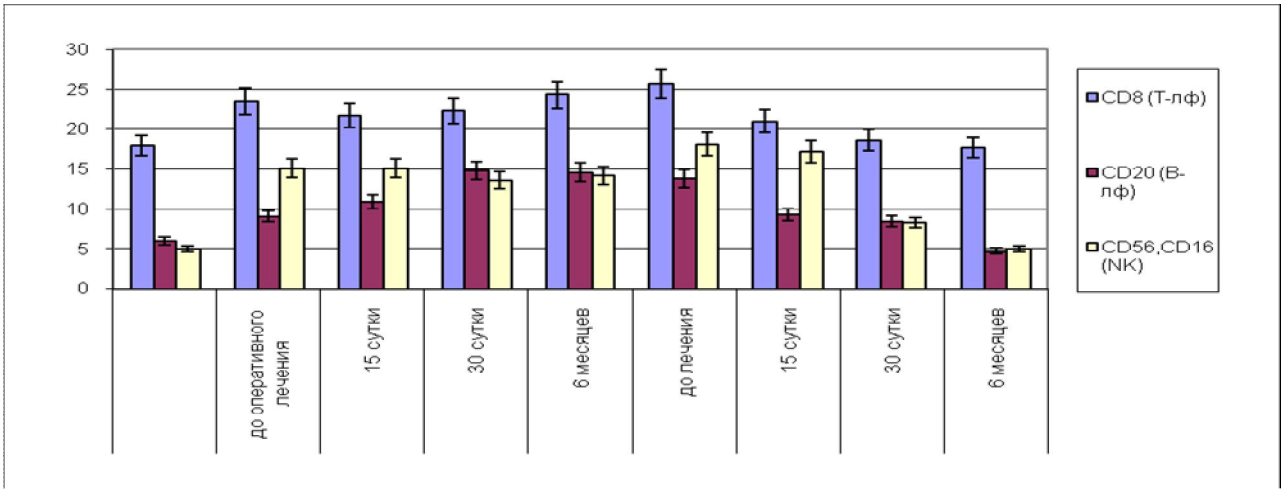

Рис. 1. CD-типирование клеток периферической крови у пациентов при использовании IL-2 цитокинотерапии при раке гортани $T_{1-2}N_0M_0$

За период наблюдения у пациентов 1-й (контрольной) группы 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) при стабильных показателях абсолютного содержания лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови с 15-х суток до 6 месяцев наблюдали увеличение показателей CD 8-лимфоцитов на 11 %, CD 20-лимфоцитов – на 25 %, NK-клеток – на 35 %. У пациентов во 2-й группе (исследования) 1-й подгруппе ($T_{1-2}N_0M_0$) в этом же периоде наблюдения количество CD 8-лимфоцитов уменьшилось – на 16 %, CD 20-лимфоцитов уменьшилось – в 2,5 раза, NK-клеток – в 3,4 раза.

К 6 месяцу у пациентов в 1-й (контрольной) группе 1-й подгруппе

($T_{1-2}N_0M_0$) наблюдали увеличение содержания CD 8-лимфоцитов на 26 %, CD 20-лимфоцитов – в 2,4 раза и NK-клеток – в 2,8 раза в сравнении с величинами параметров у здоровых лиц. У больных 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) после применения IL-2 все три показателя не имели достоверных отличий в сравнении с величинами аналогичных параметров у здоровых лиц.

У больных 2-ой группы (исследования) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) до оперативного лечения количество CD 20-лимфоцитов было большим на 18 %, NK-клеток – на 19 % в сравнении с величинами аналогичных показателей у больных 1-й (контрольной) группы 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$); у пациентов в 1-й (контрольной) группе 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) количество показателей CD 8-лимфоцитов было большим в сравнении с таковыми показателями у здоровых лиц на 42 %, CD 20-лимфоцитов – на 21 %, NK-клеток – на 31 %. У пациентов 2-й контрольной группы 1-й подгруппы количество CD 8-лимфоцитов было большим в сравнении с таковыми показателями у здоровых лиц на 42 %, CD 20-лимфоцитов – на 35 %, NK-клеток – на 44 %.

У пациентов 1-й (контрольной) группы 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) наблюдали с 15-х суток до 6 месяцев увеличение показателей: CD 8-лимфоцитов – на 34 %, CD 20-лимфоцитов – на 24 %, NK-клеток – на 10 %. У пациентов 2-й группы (исследования) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) после применения IL-2 наблюдали уменьшение показателей в период с 15-х суток до 6 месяцев CD 20-лимфоцитов – в 2 раза; NK-клетки – на 24 %. К 6 месяцу у пациентов в 1-й (контрольной) группе 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) в сравнении с величинами аналогичных параметров у здоровых лиц наблюдали увеличение содержания CD 8-лимфоцитов на 36 %, CD 20-лимфоцитов – на 46 % и NK-клеток – на 42 %.

У пациентов во 2-й группе (исследования) 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) количество CD 8-лимфоцитов было большим на 23 %, CD 20-лимфоцитов – на 43 %, NK-клеток – в 2,6 раза в сравнении с величинами аналогичных параметров у здоровых лиц, что подтверждало наличие выраженных и стойких изменений противоопухолевой иммунной реакции и позволило сделать вывод, что применение IL-2 при раке гортани $T_3N_0M_0$ не привело к восстановлению

иммунологических показателей до таковых у здоровых лиц.

У больных 1-й группы (контроля) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) до оперативного лечения количество CD 8-лимфоцитов было большим на 14 %, количество CD 20-лимфоцитов было меньшим на 49 %, NK-клеток было меньшим на 18 % в сравнении с величинами аналогичных показателей у больных во 2-й группе (исследования) 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$). У пациентов в 1-й (контрольной) группе 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$) количество показателей CD 8-лимфоцитов было большим в сравнении с таковыми показателями у здоровых лиц на 36 %, CD 20-лимфоцитов – на 30 %, NK-клеток на 34 %. У пациентов 2-й группы исследования 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) количество CD 8-лимфоцитов было большим в сравнении с таковыми показателями у здоровых лиц на 27 %, CD 20-лимфоцитов – в 2,8 раза, NK-клеток – на 46 %.

У больных 1-й (контрольной) группы 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) с 15-х суток до 6 месяцев содержание CD 20-лимфоциты увеличилось на 30 %, NK-клетки – на 22 %. У больных 2-й группы (исследования) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) с 15-х суток до 6 месяцев наблюдали увеличение количества CD 8-лимфоцитов – на 38 % и NK-клеток на – 37 %, уменьшение количества CD 20-лимфоцитов – на 21 %.

Таким образом, результаты CD-типирования клеток периферической крови у больных раком гортани свидетельствовали об отличии реакции иммунной системы у пациентов во 2-й группе (исследования) при применении IL-2 в зависимости от стадии заболевания. В 1-й подгруппе ($T_{1-2}N_0M_0$) применение IL-2 позволяло достичь нормализации изучаемых субпопуляций Т-лимфоцитарного звена. У больных во 2-й ($T_3N_0M_0$) и 3-й подгруппах ($T_4N_0M_0$) относительное содержание клеток-эффекторов, обладающих цитолитическими свойствами, было повышено по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц, что может указывать на отсутствие влияния применения рекомбинантного IL-2 человека на состояние лимфоцитарного звена противоопухолевого иммунного ответа.

У пациентов 1-й группы (контроля) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) в сравнении с величинами аналогичных показателей у пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) до оперативного лечения наблюдали увеличение

фагоцитарного числа (ФЧ) на 15 %, фагоцитарного индекса (ФИ) – на 16 %; в сравнении с величинами аналогичных параметров у здоровых лиц было выявлено у пациентов 1-й группы (контроля) 1-й подгруппы ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) увеличение ФЧ на 44 %, ФИ – на 45 %; и пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) увеличение ФЧ на 34 %, ФИ – на 35 %.

У пациентов в 1-й группе (контроля) 1-й подгруппе ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) в период с 15-х суток до 6 месяцев наблюдали увеличение ФЧ на 25 %; ФИ в этот период наблюдения уменьшился на 32 %. К 30 суткам наблюдали дисбаланс между фагоцитарной способностью и микробицидной активностью нейтрофилов: на фоне сохранения высокой фагоцитарной активности (фагоцитарное число – 62,17 % ± 3,7 %, фагоцитарный индекс – 53,5 усл.ед. ± 7,6 усл.ед.) при этом микробицидная активность нейтрофилов уменьшалась (КФМА составлял 0,42 ± 0,11).

У пациентов во 2-й группе исследования 1-й подгруппы ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) в период с 15-х суток до 6 месяцев фагоцитарное число было меньшим на 20 %, фагоцитарный индекс – на 33 %. К 30 суткам наблюдалось уменьшение функциональной активности Нф: ФЧ – 31,3 % ±3,8 %, ФИ – 48,6 усл.ед. ± 10,2 усл.ед., КФМА – 0,36 ± 0,07. К 30 суткам состояние фагоцитарного звена у пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) в сравнении с аналогичными параметрами у здоровых лиц не имело существенных отличий. Достигнутый результат носил стойкий характер. У пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1\text{-}2}N_0M_0$) к 6 месяцу признаков повышения нейтрофильной активности не выявлено.

При сравнении показателей фагоцитарного звена иммунитета у пациентов 1-й группы (контроля) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) и 2-й группы (исследования) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) до оперативного лечения выявили: у пациентов в 1-й группе контроля увеличение ФЧ на 15 %, ФИ – на 11 %. В сравнении с величинами аналогичных параметров у здоровых лиц до оперативного лечения у пациентов 1-й группы (контроля) 1-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) было выявлено увеличение ФЧ на 45 %, ФИ – на 44 %, у пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) увеличение ФЧ на 35 %, ФИ – на 37 %.

У пациентов в 1-й группе контроля 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) с 15-х суток

до 6 месяцев ФЧ увеличилось на 25 %, ФИ за этот же период уменьшился на 32 %, в сравнении с величинами аналогичных параметров у здоровых лиц и у пациентов 2-й группы (исследования) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) показатель ФЧ был увеличен в 2 раза, ФИ – на 38 %.

Во 2-й группе (исследования) 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) в период с 15-ти суток до 6 месяцев наблюдали уменьшение фагоцитарного числа на 36 %, ФИ снизился на 31 %. В сравнении аналогичными параметрами у здоровых лиц достоверных расхождений не выявили.

У пациентов 1-й группы (контроля) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) в сравнении с пациентами 2-й группы (исследования) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) до оперативного лечения было выявлено: увеличение ФЧ на 5 %, ФИ – на 20 %, в сравнении с величинами аналогичных показателей у здоровых лиц до оперативного лечения у пациентов 1-й группы (контроля) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) было выявлено увеличение ФЧ на 23 %, ФИ – на 27 %; у пациентов 2-й группы (исследования) 3-й подгруппы (TN_0M_0) увеличение ФЧ – на 27 %, ФИ – на 16 %.

В 1-й группе (контроля) 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$) в период с 15-х суток до 6 месяцев наблюдали уменьшение ФЧ на 29 %, ФИ – на 25 %.

Во 2-й группе (исследования) 3-й подгруппе ($T_4N_0M_0$) в период с 15-х суток до 6 месяцев наблюдали уменьшение фагоцитарного числа на 13 %. Достоверного изменения фагоцитарного индекса не наблюдалось.

Таким образом, применение IL-2 при раке гортани $T_4N_0M_0$ оказывало активирующее влияние на фагоцитарное звено, но повышенная фагоцитарная активность не сопровождается сопоставимым увеличением микробицидной активности нейтрофилов,что свидетельствует о незавершенном фагоцитозе.

У больных раком гортани по мере прогрессирования заболевания наблюдалась тенденция к повышению микробицидной активности Нф на фоне сохранения их высокой фагоцитарной активности.

Применение IL-2 при раке гортани$T_{1\text{-}2}N_0$ M_0 сопровождалась достоверным уменьшением микробицидной и фагоцитозной активности Нф. При раке гортани $T_3N_0M_0$ применение IL-2 также приводило к уменьшению функциональной и фагоцитозной активности Нф. При раке гортани $T_4N_0M_0$

цитокинотерапия сопровождалась активацией фагоцитоза, но без увеличения микробицидной активности фагоцитов.

Исследование концентрации IL-6 при раке гортани ($T_{1-4}N_0M_0$) при применении рекомбинантного IL-2 человека. У пациентов 1-й группы (контроля) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) в сравнении с величиной аналогичного параметра у пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) до оперативного лечения концентрация IL-6 была большей на 15 %, в сравнении с величиной аналогичного параметра у здоровых лиц – в 6 раз; в сравнении с величиной аналогичного параметра у пациентов 2-й группы (исследования) 1-й подгруппы ($T_{1-2}N_0M_0$) – в 5 раз. У пациентов в 1-й контрольной группе 1-й подгруппе к 15-м суткам наблюдалось уменьшение концентрации IL-6 в сравнении с величиной аналогичного параметра у здоровых лиц в 4,4 раза, в сравнении с пациентами 2-й группы исследования 1-й подгруппы – в 3,9 раза. На 30-е сутки концентрация IL-6 в обеих группах продолжала уменьшаться и соответствовала величине аналогичного параметра у здоровых лиц (табл. 2).

Таблица 2

Изменение концентрации IL-6 при раке гортани и применении рекомбинантного IL-2 человека (пг/мл)

Группы	Подгруппы								
	№1 $T_{1-2}N_0M_0$			№2 $T_3N_0M_0$			№3 $T_4N_0M_0$		
	До оперативного лечения	15 сутки	30 сутки	До оперативного лечения	15 сутки	30 сутки	До опера-тивного лечения	15 сутки	30 сутки
Группа здоровых лиц	29,6 ± 2,12								
1-я (контрольная) группа	175,3 ± 68,7*	40,7 ± 18,2*	26,2 ± 8,3*	285,2 ± 18,7*	76,7 ± 33,8*	58,8 ± 12,4*	267,4 ± 24,5*	171 ± 50,4*	188,2 ± 56,4*
2-я группа (исследования)	148,3 ± 72,33*	38,5 ± 19,1*	18,5 ± 8,8*	273,8 ± 43,2*	44,9 ± 9,5*	28,8 ± 8,2*	250,5 ± 60,7*	120,8 ± 24,9*	56,2 ± 188,2*

* $p < 0,05$ – достоверные различия средних величин со здоровыми лицами

У пациентов 1-й группы (контроля) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) концентрация IL-6 в сравнении с величиной аналогичного показателя у пациентов 2-й группы (исследования) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) до оперативного

лечения отличий не выявлено, в сравнении с аналогичным параметром у здоровых лиц до оперативного лечения у пациентов 1-й группы (контроля) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) было выявлено увеличение данного показателя в 9,6 раза, у пациентов 2-й группы (исследования) 2-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) – в 9,25 раза. К 15-м суткам наблюдалось снижение концентрации IL-6 в обеих группах: у пациентов в 1-й контрольной группе 1-й подгруппе – в 3,8 раза, во 2-й группе исследования 2-й подгруппе – в 6 раз. На 30-е сутки концентрация IL-6 в обеих группах продолжала уменьшаться, но только у пациентов во 2-й группе (исследования) 2-й подгруппе ($T_3N_0M_0$) она соответствовала величине аналогичного параметра у здоровых лиц.

У пациентов 1-й группы (контроля) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$), в сравнении у пациентов 2-й группы (исследования) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$), концентрации IL-6 до оперативного лечения была большей на 7 %. В сравнении с величиной аналогичного параметра у здоровых лиц до оперативного лечения было выявлено увеличение концентрации IL-6 у пациентов 1-й группы (контроля) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) в 9,0 раза и у пациентов 2-й группы (исследования) 3-й подгруппы ($T_4N_0M_0$) – в 8,5 раза. К 15-м суткам наблюдалось снижение концентрации IL-6 у пациентов в обеих группах: у пациентов в 1-й контрольной группе 3-й подгруппе – в 1,6 раза, во 2-й группе исследования 3-й подгруппе – в 2,1 раза. К 30-м суткам концентрация IL-6 в обеих группах продолжала уменьшаться. У пациентов во 2-й группе (исследования) 3-й подгруппы ($T_3N_0M_0$) превышала величину аналогичного параметра у здоровых лиц в 1,9 раза.

Таким образом, применение IL-2 при раке гортани привело к уменьшению концентрации сывороточного IL-6, выявленного у пациентов 2-й группы (исследования) во 2-й ($T_3N_0M_0$) и 3-й ($T_4N_0M_0$) подгруппах. Снижение концентрации провоспалительного цитокина (IL-6) в сыворотке крови свидетельствует о редукции воспалительной реакции в послеоперационном периоде, и, следовательно, о снижении риска гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде.

ВЫВОДЫ

1. Применение рекомбинантного IL-2 человека при раке гортани

($T_{1-2}N_0M_0$) сопровождалось в 100 % наблюдений лимфоцитарным перитуморозным инфильтратом.

2. Использование рекомбинантного IL-2 человека при раке гортани ($T_{1-3}N_0M_0$) усиливало интенсивность клеточного воспалительного инфильтрата в строме опухоли – в 50 % наблюдений отмечалась сильная 1-я степень клеточной инфильтрации.

3. Использование при раке гортани ($T_{1-2}N_0M_0$) рекомбинантного IL-2 человека приводило к изменению системной противоопухолевой иммунной реакции:

– увеличению содержания CD 8-лимфоцитов, CD 20-лимфоцитов, NK-клеток в периферической крови до оперативного лечения с последующим их уменьшением (к 6 месяцу);

– увеличению фагоцитарной и микробицидной активности нейтрофилов периферической крови до оперативного лечения, с последующей (к 6 месяцу послеоперационного периода) нормализацией этих показателей.

4. Применение рекомбинантного IL-2 человека при раке гортани $T_{1-4}N_0M_0$ привело к снижению к 30 суткам концентрации сывороточного IL-6, что уменьшало риск гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение рекомбинантного интерлейкина-2 человека в комплексе комбинированного лечения может быть рекомендовано при раке гортани $T_{1-2}N_0M_0$.

2. Применение при раке гортани рекомбинантного интерлейкина-2 человека целесообразно в предоперационный период с целью усиления лимфоцитарнарной инфильтрации опухолевого узла.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 **Шаталов И.Д.,** Киселев В.В., Репьев А.А., Киселев А.Б. Оказание специализированной помощи при злокачественных опухолях гортани в г. Новосибирске // **Российская оториноларингология**. 2010. №2. С.140-143, автора – 0,13 п.л.

2. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б., Андриенко Л.А. Особенности иммунологической реактивности у больных местно-распространёнными формами рака гортани ($T_{1-3}N0M0$) // **Российская оториноларингология**. 2010. № 3. С.163-166, автора – 0,17 п.л.

3. **Шаталов И.Д.,** Надеев А.П., Киселев А.Б. Патоморфологическая характеристика рака гортани при использовании рекомбинантного интерлейкина-2 человека // **Медицина и образование в Сибири: электронный журнал.** 2012. №3. 4 с., автора – 0,17 п.л.

4. **Шаталов И.Д**., Киселев А.Б., Андриенко Л.А. Особенности иммунологической реактивности у больных местно-распространенными формами рака гортани (T1-3N0M0) // Российская оториноларингология. 2010. Приложение № 1. С.418-421, автора – 0,17 п.л.

5. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б. Восприимчивость к иммуностимулирующей терапии больных местнораспространенными формами рака гортани (T1-3N0M0) // Сибирский онкологический журнал. Приложение № 1. Томск, 2010. С.114, автора – 0,06 п.л.

6. **Шаталов И.Д.,** Надеев А.П., Киселев А.Б. Лимфоплазмоцитарная реакция стромы опухоли при раке гортани при применении цитокинотерапии // Проблемы саногенного и патогенного эффектов эндо- и экзоэкологического воздействия на внутреннюю среду организма : материалы XI Евразийского симпозиума по вопросам фундаментальной и прикладной медицины. Чолпон-Ата, 2012. С.165-167, автора – 0,13 п.л.

7. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б. Отдаленные результаты хирургического лечения больных раком гортани в Новосибирске и Новосибирской области // Авиценна-2009 : сборник материалов ежегодной конкурс-конференции студентов и молодых ученых. Новосибирск,2009. С. 302 – 303, автора – 0,13 п.л.

8. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б. Эффективность иммуностимулирующей терапии в условиях in vitro у больных местно-распространенными формами рака гортани (T1-3N0M0) // Перспективы научно-практической оториноларингологии : сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции оториноларингологов Сибири и Дальнего

востока. Благовещенск, 2010 (выпуск 8). С.144-146, автора – 0,19 п.л.

9. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б. Иммуностимулирующая цитокин-терапия больных местно-распространенными формами рака гортани(T1-3N0M0) // Основные направления оториноларингологии : сборник статей межрегиональной научно-практической конференции оториноларингологов. Барнаул, 2010. С.136-139, автора – 0,25 п.л.

10. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б., Ефремов А.В. Влияние IL-2 цитокинотерапии на лимфоплазмоцитарную инфильтрацию опухолевого узла при раке гортаниалов // Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции оториноларингологов, посвященной 75-летию НГМУ Росздрава и кафедры оториноларингологии. Новосибирск, 2010. С.93-97, автора – 0,21 п.л.

11. **Шаталов И.Д.** Киселев А.Б., Кожевников В.С. Лимфоплазмоцитарная инфильтрация местно распространенного рака гортани $T_{1-2}N_0M_0$ после цитокинотерапии рекомбинантным IL-2 человека // Современные технологии в оториноларингологии : сборник статей межрегиональной научно-практической конференции оториноларингологов. Барнаул, 2011. С. 145-150, автора – 0,25 п.л.

12. **Шаталов И.Д.,** Киселев А.Б., Кожевников В.С. Влияние IL-2 цитокинотерапии на системный и местный противоопухолевый иммунитет больных местно распространенным раком гортани $T_{1-4}N_0M_0$ // Актуальные вопросы оториноларингологии : материалы межрегиональной научно-практической конференции оториноларингологов Сибири и Дальнего Востока. Благовещенск, 2011. С.176-181, автора – 0,25 п.л.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Нф	нейтрофилы
IL-2	нтерлейкин-2
IL-6	интерлейкин-6
КФМА	коэффициент функциональной метаболической активности
НСТ-тест	тест восстановления нитросинего тетразолия