

© O.Yu.Leplina, V.V.Stupak, Yu.P.Kozlov et al., 2007

О.Ю.Леплина, В.В.Ступак*, Ю.П.Козлов*, И.В.Пендюрин*, А.А.Останин, Е.Р.Черных**ИММУНОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА***ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН & *ФГУ «НИИ травматологии и ортопедии» Новосибирск, Россия***АБСТРАКТ**

В работе проведен анализ эффективности иммунотерапии с использованием дендритных клеток, генерируемых в присутствии GM-CSF и IFN- α (ИФН-ДК), в лечении больных злокачественными глиомами головного мозга. Иммунотерапия с использованием ИФН-ДК характеризовалась хорошей переносимостью и не приводила к развитию побочных токсических реакций. Клиническая апробация разработанного подхода показала, что иммунотерапия с использованием ИФН-ДК позволяет индуцировать антиген-специфический иммунный ответ, улучшить показатели качества жизни и выживаемости пациентов злокачественными глиомами.

Ключевые слова:*иммунотерапия, дендритные клетки, злокачественные глиомы.*

Введение. В лечении злокачественных опухолей головного мозга (ЗОГМ) используется комплексный подход, включающий оперативное вмешательство, лучевую терапию и химиотерапию. Тем не менее, средняя продолжительность жизни больных при низкодифференцированных глиомах остается крайне низкой, что делает актуальным поиск новых терапевтических стратегий [8]. Ранее нами было показано, что комбинированная иммунотерапия, основанная на сочетании адоптивной иммунотерапии и цитокинотерапии, позволяет достоверно увеличить показатели выживаемости больных ЗОГМ [2,4,5]. Однако развитие рецидивов в более поздние сроки свидетельствует о целесообразности поддержания противоопухолевого иммунитета после завершения курса иммунотерапии и диктует необходимость разработки более эффективных методов генерации цитотоксических лимфоцитов.

В этом плане особый интерес представляют дендритные клетки (ДК). Поскольку ДК способны презентировать опухолеассоциированные антигены и запускать противоопухолевый иммунный ответ, иммунизация ДК, нагруженными опухолевыми антигенами (ДК-вакцины), рассматривается как один из новых подходов в иммунотерапии злокачественных опухолей [7]. Традиционно ДК генерируют путем культивирования моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IL-4, однако для получения ДК можно также использовать GM-CSF и IFN- α , и такой путь генерации представляется более физиологичным [6]. «Интерфероновые» ДК (ИФН-ДК) имеют ряд преимуществ - генерируются быстрее по времени, характеризуются высокой способностью к захвату антигена, сохраняют стабильность в отсутствие цитокинов, имеют более высокую миграционную активность и эффективно стимулируют Th1 ответ. Проведенные нами ранее исследования показали принципиальную возможность генерации ИФН-ДК у больных ЗОГМ [1]. Целью настоящей работы явилась оценка безопасности и эффективности комбинированной иммунотерапии с использованием ИФН-ДК в комплексном лечении внутримозговых злокачественных опухолей.

Contact Information:Prof. Elena Chernykh
E-Mail: ct_lab@mail.ru

Материалы и методы. Исследуемую группу составили 119 больных ЗОГМ в возрасте от 16 до 69 лет. Гистологически верифицированная глиобластома (ГБ) была диагностирована у 42% больных, астроцитомы 3 степени анаплазии (АА) – у 58% пациентов. Все больные ЗОГМ были разделены на 2 подгруппы, сопоставимые по полу/возрасту больных, гистологическим вариантам внутримозговых опухолей, исходному уровню качества жизни. Основная группа включала 39 пациентов, которым оперативное лечение и радиотерапия были дополнены комбинированной иммунотерапией (КИТ) с использованием ДК. Группу сравнения составили 80 больных, которым проводилось оперативное удаление опухоли и лучевая терапия (55-60 Грэй) на область удаленной опухоли. КИТ проводилась в режиме пилотных исследований в послеоперационном периоде в соответствии с разработанным патентом [3] и включала курс адоптивной иммунотерапии и курс ДК-вакцинаций. Курс адоптивной иммунотерапии заключался в 2-кратном локорегиональном введении лимфокин-активированных киллерных клеток (ЛАК) и цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) в ложе удаленной опухоли. Для генерации ЛАК мононуклеарные клетки (МНК) культивировали с рекомбинантным IL-2 (50 МЕ/мл, «Ронколейкин», Биотех, С-Пб) в течение 48 ч, после чего вводили через катетер в ложе удаленной опухоли в комбинации с Ронколейкином в дозе 250000 МЕ. ЦТЛ получали путем культивирования МНК больных с ДК, нагруженными опухолевыми антигенами, в присутствии Ронколейкина (50 МЕ/мл) в течение 5 дней, после чего вводили в ложе удаленной опухоли в комбинации с Ронколейкином в дозе 250000 МЕ. Антигенный материал (лизат опухолевых клеток) для загрузки ДК получали из фрагмента аутологичной опухоли больного, в результате 5-кратного замораживания/размораживания, и использовали в концентрации 0,1 мг/мл по белку. Курс вакцинации включал 6 подкожных инъекций ДК, нагруженных опухолевыми антигенами, в дозе 10×10^6 введение (в 4-6 точек) с кратностью вакцинаций – 1 раз в 2 недели в сочетании с подкожным введением Ронколейкина в дозе 250000 МЕ.

Дендритные клетки генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК в течение 3 сут в полной культуральной среде RPMI-1640 в присутствии GM-CSF (Sigma, США) 40 нг/мл и IFN- α 1000 МЕ/мл

(Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч в присутствии лейкинферона (НПФ «Интекор», Москва) в конечном разведении 1:40.

Результаты и обсуждение. Для анализа эффективности генерации противоопухолевого ответа оценивали интенсивность иммунного ответа на опухолевые антигены (ОА), содержащиеся в лизате опухолевых клеток, до начала курса вакцинаций, а также через 3 и 6 вакцинаций. Сенсибилизация к ОА *in vitro* проявлялась усилением пролиферативного ответа МНК (табл. 1). Исходно антигены лизата опухолевых клеток не стимулировали пролиферации МНК. После 6 вакцинаций отмечалось 7- и 10-кратное усиление пролиферации в ответ на ОА в дозе 0,1 и 0,01 мг/мл, соответственно. При этом достоверного усиления пролиферативного ответа МНК больных на контрольный антиген не наблюдалось. Таким образом, индуцированный иммунный ответ, был направлен преимущественно к опухолеассоциированным, а не тканевым антигенам.

Таблица 1.

Индукция антиген-специфического ответа в процессе вакцинации дендритными клетками больных ЗОГМ

	До вакцинации	После трех вакцинаций	После шести вакцинаций
Спонтанная пролиферация	425 ± 74	321 ± 88	666 ± 145
Опухолевый АГ 0,01 мг/мл	663 ± 154 (1,65 ± 0,4)	363 ± 121 (1,3 ± 0,3)	5170 ± 1507* (10,9 ± 4,9)
Опухолевый АГ 0,1 мг/мл	1083 ± 280 (2,4 ± 0,56)	554 ± 243 (1,7 ± 0,6)	3632 ± 474* (7,6 ± 3,1)
Контрольный АГ 0,01 мг/мл	450 ± 57 (1,1 ± 0,35)	815 ± 79 (2,1 ± 0,6)	1050 ± 245 (1,36 ± 0,7)
Контрольный АГ 0,1 мг/мл	715 ± 89 (1,6 ± 0,4)	976 ± 85,8 (2,5 ± 0,8)	1293 ± 101 (1,99 ± 0,5)

Примечание: представлены средние значения пролиферативного ответа (имп/мин) МНК больных (n=10) на специфический опухолевый антиген в различных концентрациях и на контрольный антиген (экстракт мозговых тканей человека). В скобках приведены индексы влияния, вычисляемые как частное от деления индуцированной антигеном (или контрольным антигеном) пролиферации к спонтанной пролиферации. * - $P < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с состоянием до начала вакцинаций (U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

Дополнительно, для оценки развития иммунного ответа на опухолевые антигены у 25 пациентов была также исследована реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в кожном тесте *in vivo*. Исходно кожная проба на ОА была отрицательной у всех пациентов. В то же время после 3 и 6 иммунизаций положительная кожная проба регистрировалась у 7 (28%) и 16 (64%) пациентов, соответственно.

Иммунотерапия была хорошо переносима и не вызывала развития побочных токсических реакций. Более того, у больных, получающих иммунотерапию, к моменту окончания стационарного лечения, т.е. после завершения этапа адоптивной иммунотерапии, отмечалась более выраженная положительная клиническая динамика.

ка. Так, исходно (на 7-9 сут после операции) общемозговая симптоматика выявлялась с равной частотой у большинства больных основной группы (73,8%) и группы сравнения (72,2%). В то же время перед выпиской из стационара общемозговая симптоматика сохранялась только у 2 пациентов (5,1%) основной группы, тогда как в группе сравнения выявлялась достоверно чаще – в 20% случаев. Анализ индекса качества жизни (ИКЖ) по Карновскому показал, что исходно пациенты сформированных групп не различались по данному показателю ($59,3 \pm 1,9$ и $55,2 \pm 1,9$ баллов в основной и контрольной группе, соответственно). Через 6, 12 и 24 мес после операции показатели ИКЖ в основной группе были достоверно выше ($84 \pm 1,4$; $86 \pm 1,6$; $91 \pm 2,3$ балла), чем в группе сравнения ($66 \pm 1,6$; $66 \pm 1,8$ и $61 \pm 3,7$ баллов, соответственно).

Относительное количество выживших больных в основной группе к исходу 12, 24 и 36 мес было достоверно выше, чем в группе сравнения (табл. 2). Причем в группе больных с астроцитомой достоверные различия в выживаемости начинали регистрироваться к 24 мес наблюдения и сохранялись на период 36 мес. В то же время, у больных глиобластомами, которые характеризуются крайне неблагоприятным прогнозом, различия в показателях выживаемости фиксировались уже на период 12 мес. К исходу 24 мес показатель выживаемости при ГБ в группе сравнения снижался до нуля, тогда как в основной группе 3 из 8 пациентов (37,5%) были живы и не имели рецидива.

В литературе имеются лишь единичные сообщения о клинической апробации вакцин на основе ДК [9,10]. Следует отметить, что во всех этих исследованиях авторы не наблюдали аутоиммунных нейротоксических реакций. Полученные нами результаты согласуются с этими данными и являются еще одним аргументом в пользу безопасности и обоснованности иммунотерапии у больных ЗОГМ. При этом нами впервые апробирован новый тип ДК, генерируемых в присутствии IFN-а, которые по своим функциональным свойствам могут превосходить ДК, полученные в стандартном протоколе с использованием GM-CSF и IL-4.

Литература

1. Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Козлов Ю.П., и др. Частично-зрелые дендритные клетки как потенциальная основа для индукции противоопухолевого ответа у больных злокачественными глиомами // Мед. иммунология.- 2005.- Т. 7, № 4.- С. 365-374.
2. Останин А.А., Центнер М.И., Хонина Н.А., и др. Антиген-специфическая иммунотерапия в комплексном лечении больных со злокачественными опухолями головного мозга. // Вопросы онкологии.- 2003.- Т. 49, № 2.- С. 170-175.
3. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Останин А.А., и др. Способ иммунотерапии злокачественных опухолей головного моз-

Таблица 2.

Анализ выживаемости больных в процессе терапии с использованием ДК

	12 мес		24 мес		36 мес	
	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа	Группа сравнения	Основная группа
Все глиомы	52,5 % (42/80)	74 %* (29/39)	27,5 % (22/80)	61 %* (14/23)	19 % (15/80)	50 %* (4/8)
Астроцитомы	70 % (33/47)	79 % (19/24)	47 % (22/47)	73 %* (11/15)	32 % (15/47)	57 %* (4/7)
Глиобластомы	39 % (9/33)	66,7 %* (10/15)	0 % (0/33)	40,0 %* (4/10)	0 % (0/33)	0 % (0/1)

Примечание: представлено относительное и абсолютное количество больных, выживших к сроку 12, 24 и 36 мес. * - $P < 0,05$ – достоверность различий частот по сравнению с контрольной группой посчитана методом кси-квадрата (χ^2).

- га // Патент №2262941, приоритет от 05.01.2004 г.
- Черных Е.Р., Ступак В.В., Центнер М. И., и др. Комбинированная иммунотерапия в лечении злокачественных опухолей головного мозга // Мед. иммунология.- 2002.- Т. 4, № 4/5.- С.583-592.
 - Черных Е.Р., Ступак В.В., Центнер М.И., и др. Эффективность комбинированной иммунотерапии в комплексном лечении злокачественных глиом головного мозга // Сибирский онкологический журнал.- 2004.- № 2/3.- С. 85-88.
 - Santini S.M., Pucchini T., Lapenta C., et al. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // Stem cells.- 2003.-Vol. 21.- P. 357-362.
 - Santini S.M., Belardelli F. Advances in the use of dendritic cells and new adjuvants for the development of therapeutic vaccines // Stem Cells.- 2003.- Vol. 21.- P. 495 - 505.
 - Tjoa B.A., Salgaller M.L. Progress in active-specific immunotherapy of brain malignancies// Expert Opin Investig Drugs.- 2000.- Vol. 9.- P. 2093-2101.
 - Yoshida S., Morii K., Watanabe M., et al. The generation of antitumoral cells using dendritic cells from the peripheral blood of patients with malignant brain tumors // Cancer Immunol Immunother.- 2001.- Vol. 50.- P. 321-327.
 - Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M., et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration // Cancer Res.- 2001.- Vol. 61.- P. 842-847

O.Yu.Leplina, V.V.Stupak*, Yu.P.Kozlov*, I.V.Penduyrin*, A.A.Ostanin, E.R.Chernykh
IMMUNOTHERAPY OF MALIGNANT BRAIN TUMORS

*Institute of Clinical Immunology RAMS SB,
 *Institute of traumatology and orthopedia
 Novosibirsk, Russia*

ABSTRACT:

The efficiency of immunotherapy with dendritic cells, generated in presence of GM-CSF and IFN- α (IFN-DCs), in treatment of patients with malignant gliomas was analyzed. IFN-DC-based immunotherapy was well tolerated and did not cause side toxic reactions. The clinical approbation of developed approach demonstrated, that immunotherapy with IFN-DCs allowed to induce antigen-specific anti-tumor immune response, to improve a quality life index and survival of patients with malignant gliomas.

Key words:

immunotherapy, dendritic cells, malignant gliomas

© A.A.Litvin, O.G.Jarikov, G.A.Senchuk, L.A.Mauda Shadi, 2007

А.А.Литвин, О.Г.Жариков, Г.А.Сенчук, Л.А.Мауда Шади
ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОСЛОЖНЁННОГО ТЕЧЕНИЯ
ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

*«Гомельская областная клиническая больница»
 Гомель, Беларусь*

АБСТРАКТ

В статье производится сравнительный анализ существующих способов прогнозирования осложнённого течения острого панкреатита, описывается современный способ прогнозирования с использованием «искусственных нейронных сетей». По результатам исследования, точность результатов при нейросетевом моделировании составляет 90%, специфичность – 96%. Метод позволяет добиться более высокой степени точности прогноза, оптимизировать раннюю диагностику инфицированного панкреонекроза, выбрать адекватную лечебно-диагностическую тактику.

Ключевые слова:

прогнозирование, острый панкреатит, искусственные нейронные сети.

Актуальность темы исследования и данные литературы.

Проблема острого панкреатита (ОП) является в настоящее время одной из самых сложных в неотложной хирургии органов брюшной полости [1,3,6]. В последние годы наряду с отчетливой тенденцией к увеличению числа больных острым панкреатитом чаще отмечаются и гнойно-септические осложнения заболевания, встречающиеся в 12 - 30% наблюдений панкреонекроза [4,7]. Для идентификации больных с высоким риском осложнённого течения ОП наибольшее признание в мировом сообществе получили 3 экспертных системы: Ranson, Glasgow (Imrie) и APACHE II. При анкетировании хирургических стационаров России получены следующие данные [5]: только 29% опрошенных хирургов используют систему APACHE II, критерии Ranson и Glasgow применяют лишь 27 и 5% респондентов соответственно. Основными причинами недостаточно частого использования этих систем является их невысокая точность и трудоёмкость.

По данным ряда исследований, добиться более высокой степени точности прогноза позволяют «искусственные нейронные сети» (ИНС) (англ. – «artificial neural networks») [2,11] Этот метод представляет собой нелинейную систему, позволяющую гораздо лучше классифицировать данные, чем обычно используемые линейные методы. В приложении к медицинской диагностике ИНС дают возможность значительно повысить специфичность метода, не снижая его чувствительности [12].

Contact Information:

Dr. Oleg Jarikov
 E-Mail: jarikov@nostra.by