

*И.И. Антонева, Т.В. Абакумова, С.С. Пирмамедова, Т.П. Генинг, Д.Р. Долгова,
С.О. Генинг, В.Ю. Щеголева*

Влияние химиотерапии на стандартных растворителях и на аутологичных жидких тканях на цитокиновый статус и нейтрофилы периферической крови больных раком яичников

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Использование химиотерапии на стандартных растворителях прекращают у каждой четвертой больной раком яичников из-за развития выраженных побочных эффектов. Метод аутогемохимиотерапии изменяет фармакокинетику препарата и значительно снижает частоту и выраженность побочных эффектов. С целью оценки влияния неoadьювантной химиотерапии на аутологичных жидких тканях и на стандартных растворителях на цитокиновый статус и нейтрофилы в периферической крови 244 у первичных больных раком яичников III-IV стадии на фоне полихимиотерапии по схеме AP (цисплатин 75 мг/м², доксорубицин 50 мг/м²) при стандартном внутривенном введении и аутогемохимиотерапии оценивали количество нейтрофилов и их способности генерировать активные формы кислорода и уровень интерлейкинов IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-10, IL-18 и TNF- α . Установили, что эффективность полихимиотерапии связана с редокс-статусом нейтрофилов и цитокиновым статусом периферической крови, зарегистрированными до начала неoadьювантной химиотерапии. Значимым для больных с прогрессированием опухоли является повышенное абсолютное и относительное количество нейтрофилов со сниженной способностью к продукции активных форм кислорода. Для больных с отсутствием ответа опухоли значимым является высокий уровень сывороточных IL-10 и IL-18. Для больных с полным или частичным ответом опухоли значимым является сниженный по сравнению с нормой уровень IL-6. Значимых различий показателей нейтрофильного и цитокинового статуса при обоих способах введения химиопрепаратов не установлено. Показатели сывороточных IL-10, IL-18 и IL-6 могут быть использованы для прогнозирования ответа опухоли на неoadьювантную химиотерапию по схеме AP.

Ключевые слова: полихимиотерапия, аутогемохимиотерапия, нейтрофилы, цитокины, рак яичников

Лечение цитостатиками почти у каждой четвертой больной раком яичников (РЯ) прекращают из-за развития выраженных побочных эффектов [6]. Предварительная инкубация (преинкубация) химиопрепаратов с компонентами крови позволяет, по мнению авторов [1, 3, 14, 16, 17], пролонгировать терапевтические эффекты препарата и снизить дозозависимую токсичность. Метод аутогемохимиотерапии (АГХТ) предусматривает реинфузию клеток крови после их инкубации с лекарственными средствами. Установлено, что это приводит к образованию качественно новых противоопухолевых соединений: цитостатик - форменный элемент и цитостатик - белок. По мнению авторов [4, 8], это объясняет низкую дозозависимую токсичность и выраженную противоопухолевую эффективность АГХТ по сравнению с полихимиотерапией (ПХТ) на традиционных растворителях. Установлено, что нейтрофилы (Нф), входящие в состав опухолевого окружения, активно участвуют в формировании и прогрессировании опухоли, в развитии резистентности к химиотерапии [10, 12]. Нф поступают в опухолевое микроокружение из циркулирующей крови. Поэтому их функциональное состояние (редокс-зависимые процессы, способность к секреции цитокинов) будет определять их поведение в опухолевом микроокружении. Кроме того, активные формы кислорода, продуцируемые циркулирующими Нф, обладают канцерогенным эффектом [9, 15].

Цель исследования - оценить влияние неoadьювантной химиотерапии на аутологичных жидких тканях (НАГХТ) и на стандартных растворителях (НАХТ) на цитокиновый статус и Нф периферической крови больных РЯ.

Материал и методы

Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «основами законодательства РФ об охране здоровья граждан». Получено разрешение локального комитета по биоэтике ИМЭиФК ФГБОУВО «Ульяновский государственный университет» и информированное согла-

сие пациенток. В исследование включены 244 первичных больных РЯ IIIc-IV стадии по FIGO, и 24 практически здоровых женщины сопоставимого возраста (группа контроля). Подбор пациенток проводили по строго определенным критериям: возраст 48-70 лет (включительно); отсутствие острых воспалительных заболеваний; отсутствие в анамнезе хирургических вмешательств давностью менее года (включая стоматологические). Пациентки получали 2 курса НАХТ по схеме AP (цисплатин 75 мг/м², доксорубин 50 мг/м² внутривенно капельно). 50 пациенток с РЯ получали по схеме AP НАХТ и 50 пациенток – НАГХТ. Для этого 300 мл крови из вены забирали в гемакон с 50 мл глюкозы. Затем кровь распределяли в 2 гемакона, в каждый гемакон вводили цисплатин в дозе 70 мг/м² и доксорубин в дозе 50 мг/м². Введение химиопрепаратов проводили с интервалом 21 день, 2 курса. После НАХТ проводилась оптимальная и субоптимальная циторедукция. Эффективность НАХТ оценивалась по результатам клинических, инструментальных исследований, уровню маркера СА-125 и по системе «Recist1.1», согласно рекомендациям ВОЗ и RUSSCO.

До начала лечения, на 3-ий и 14-ий день после введения химиопрепаратов оценивали общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное количество Нф, способность Нф генерировать АФК в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [7] и по уровню активности миелопероксидазы [5]. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Уровень интерлейкинов (IL-1β, IL-6, IL-10, IL-18, TNF-α и IL-1Ra) в сыворотке крови определяли твердофазным иммуноферментным методом с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест-Волга» (Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета прикладных программ Statistica for Windows` 6.0. Для оценки значимости различий средних значений показателей выборок использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

Обсуждаются результаты с достоверностью различий при p≤0,05 и с тенденцией различий при p>0,05-0,1.

Результаты

Установлено, что количество лейкоцитов, абсолютное и относительное количество Нф, повышенные по сравнению с донорами, значительно снижаются на 14-й день после первого курса НАХТ и сохраняются на этом уровне на 3-й и 14-й день после 2-го курса НАХТ (рис. 1). На фоне НАГХТ количество лейкоцитов и относительное количество Нф снижается на 14-й день 1-го курса, значительно не отличается от уровня до введения на 3-й день и резко снижается на 14-й день после 2-го курса (рис.1).

Активность МПО, значительно повышенная в Нф больных РЯ по сравнению с Нф доноров снижается на 14-й день 1-го и 2-го курсов НАГХТ практически до уровня интактных (рис. 1). На фоне НАХТ активность МПО значительно не изменяется. Количество Нф, активных в спонтанном НСТ-тесте, значительно не изменяется на фоне НАХТ как на аутологических жидких тканях, так и на стандартных растворителях (рис. 1). Оценка статуса периферических Нф больных РЯ с точки зрения эффективности последующей химиотерапии показала, что прогрессирование опухоли в отличие от полного ответа опухоли характеризуется значимо более высокими показателями общего количе-

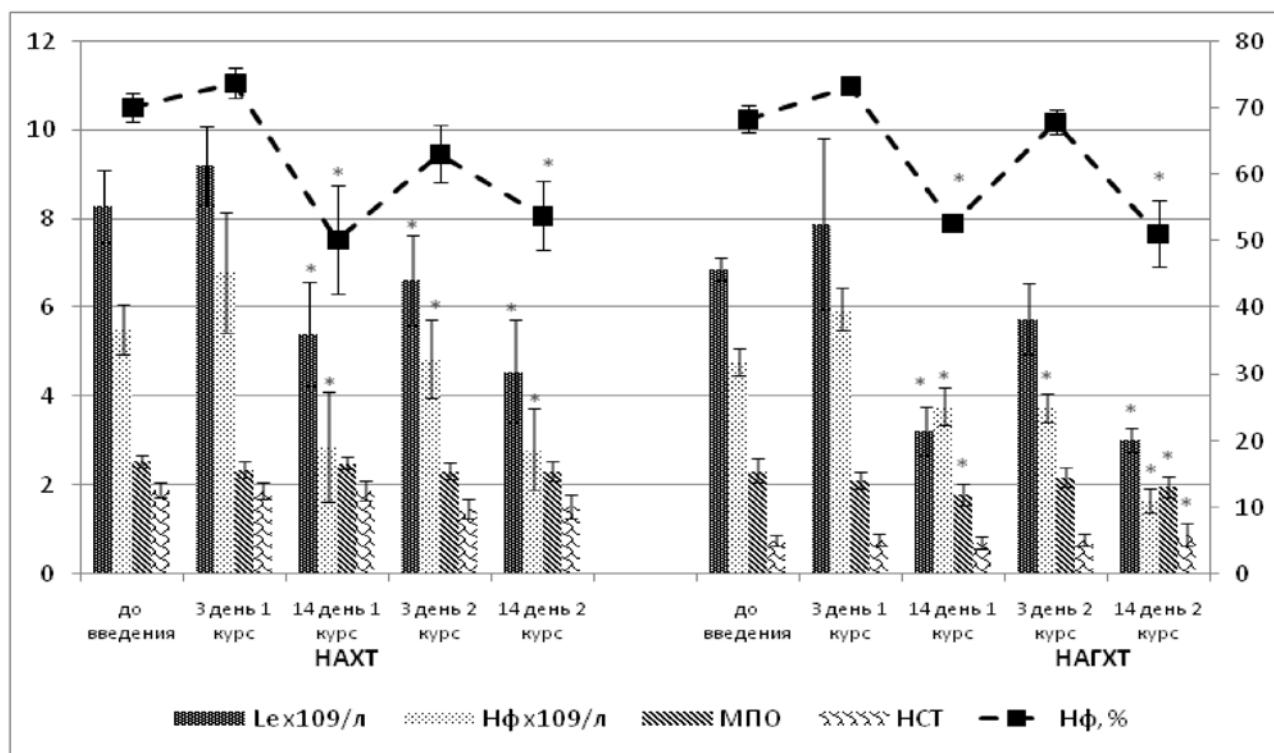


Рис.1. Показатели нейтрофилов периферической крови больных раком яичников на фоне НАХТ и НАГХТ по схеме AP
* - данные статистически значимо отличаются от аналогичных до введения химиопрепаратов

ства лейкоцитов, абсолютного и относительного количества Нф и значимо меньшей интенсивностью продукции АФК, оцениваемой по активности МПО и показателям НСТ-теста (табл. 1).

Существует мнение, что цитокины, праймируя, или активируя Нф, запускают процессы, модулирующие внутриклеточные регуляторные системы [9, 11]. Мы определили уровень IL-1 β , IL-1RA, IL-10, IL-6, IL-18 и TNF- α у пациенток с различным ответом опухоли до начала ПХТ (табл. 1). Установлено, что уровень IL-10 значимо повышен во всех группах по сравнению с контролем. При этом, в группе с прогрессированием опухоли он был значимо выше уровня в группе с полным ответом (табл. 1). Как на фоне НАХТ, так и НАГХТ уровень IL-10 значимо снижался только на 14 день второго курса, не достигая, однако, нормального значения.

Нами установлено снижение уровня IL-6 у больных с распространенным раком яичников. При этом, в группах со стабилизацией и прогрессированием опухоли до начала лечения уровень IL-6 был значимо выше, по сравнению с группами и в которых наблюдался полный или частичный ответ опухоли на ПХТ. На фоне НАХТ и НАГХТ происходило снижение уровня IL-6 (рис. 2).

Нами не установлено значимых различий уровней TNF- α в группах больных с разным типом ответа опухоли на НАХТ. Однако показано, что на фоне НАГХТ, по сравнению с группой НАХТ уровень TNF- α , сниженный по сравнению с нормой, стабильно сохраняется в течение обоих курсов лечения (рис. 2).

Нами установлено резкое и значимое возрастание уровня IL-18 в сыворотке крови больных РЯ по сравнению с донорами. При этом его

уровень до начала ПХТ был выше у больных с последующим прогрессированием опухоли по сравнению с больными, у которых был получен полный или частичный ответ (табл. 1). Уровень IL-18 на фоне НАХТ и НАГХТ значимо не различался (рис. 2).

Нами установлено, что количество IL-1 β , значимо сниженное в сыворотке крови у больных РЯ по сравнению со здоровыми донорами, не отличается значимо в группах с различным ответом опухоли (табл. 1). На фоне НАХТ имеет место дальнейшее снижение уровня IL-1 (рис. 2). На фоне НАГХТ повышение уровня IL-1 имеет место только на 3-й день первого курса (рис. 2).

Нами не установлено значимых различий уровней TNF- α в группах больных с разным типом ответа опухоли на НАХТ. Однако показано, что на фоне НАГХТ, по сравнению с группой НАХТ уровень TNF- α , сниженный по сравнению с нормой, стабильно сохраняется в течение обоих курсов лечения (рис. 2).

Нами установлено резкое и значимое возрастание уровня IL-18 в сыворотке крови больных РЯ по сравнению с донорами. При этом его уровень до начала ПХТ был выше у больных с последующим прогрессированием опухоли по сравнению с больными, у которых был получен полный или частичный ответ (табл. 1). Уровень IL-18 на фоне НАХТ и НАГХТ значимо не различался (рис. 2).

Нами установлено, что количество IL-1 β , значимо сниженное в сыворотке крови у больных РЯ по сравнению со здоровыми донорами, не отличается значимо в группах с различным ответом опухоли (табл. 1). На фоне НАХТ имеет место дальнейшее снижение уровня IL-1 (рис. 2). На фоне НАГХТ повышение уровня IL-1 имеет место только на 3-й день первого курса (рис. 2).

Таблица 1. Иммунологические показатели больных РЯ до лечения в зависимости от эффективности химиотерапии

Показатели \ Группы	Полный ответ n=9	Частичный ответ n=47	Стабилизация n=24	Прогрессирование n=20	Здоровые доноры n=24
Le1 x10 ⁹ /л	7,24±0,72	7,35±0,55	7,20±0,46	8,55±0,88 [*]	6,40±0,68
Нф, %	66,12±3,55	68,96±2,04	71,00±1,12 [*]	73,08±2,06 [*]	55,90±4,40
Нф x10 ⁹ /л	4,83±0,01	4,83±0,02	5,09±0,08 [*]	6,05±0,09 [*]	3,60±0,03
МПО, СЦК	2,59±0,08	2,43±0,11	2,37±0,06 [*]	2,06±0,02 [*]	1,56±0,17
НСТ, СЦК	1,37±0,09	1,33±0,14	1,39±0,07	1,22±0,05 [*]	0,83±0,06
IL-1 β , пг/мл	2,56±0,23	4,63±0,56 [*]	2,53±0,12	2,27±0,22	7,98±2,55
IL-10, пг/мл	9,31±1,12	8,67±0,98	10,49±1,34	12,33±1,25 [*]	2,62±1,03
TNF α , пг/мл	2,3±0,21	1,68±0,11 [*]	2,53±0,19	2,30±0,17	16,95±2,82
IL-1Ra, пг/мл	1129,78 ±11,23	980,60 ±10,03 [*]	805,25 ±8,26 [*]	1192,80 ±12,37	219,07±9,44
IL-6, пг/мл	17,88±1,38	16,91±1,05	44,77±2,34 [*]	35,11±1,16 [*]	47,22±2,83
IL-18, пг/мл	274,38 ±5,26	245,42 ±4,18	272,27 ±4,39	290,93 ±6,01	87,59 ±3,72

Примечание: ^{*} - по сравнению с группой с полным ответом

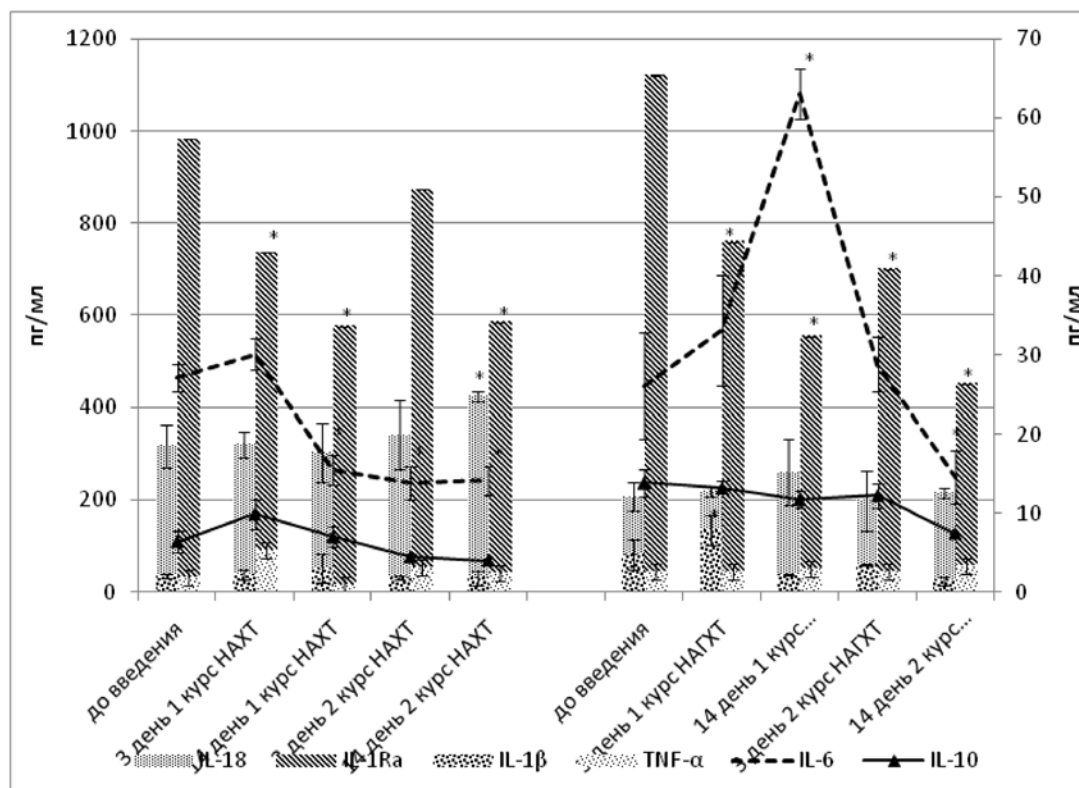


Рис.2. Цитокины сыворотки крови больных РЯ на фоне НАХТ и НАГХТ по схеме AP
* - данные статистически значимо отличаются от аналогичных до введения химиопрепаратов

Нами установлено резкое и значимое повышение уровня IL-1Ra в сыворотке больных РЯ по сравнению с нормой (табл. 1). При этом максимально высокие уровни IL-1Ra имели место у больных в группе с полным ответом и прогрессированием опухоли. Минимальный уровень ингибитора IL-1β имел место в группе со стабилизацией опухоли (табл.1). На фоне НАХТ и НАГХТ имело место достоверное снижение уровня IL-1Ra, не достигающего, однако, контрольных величин (рис. 2).

Обсуждение

Анализ цитокинового статуса сыворотки крови больных с распространенным РЯ показал значимые изменения уровней всех изученных цитокинов по сравнению с нормой. При этом резко повышенный уровень IL-10, супрессирующий продукцию практически всех провоспалительных цитокинов, IL-1, IL-6 и TNF-α [2], коррелировал со сниженным уровнем этих цитокинов. При анализе групп с различным ответом опухоли уровень IL-10 прогрессивно нарастал в ряду групп с полным ответом, частичным ответом, стабилизацией и прогрессированием опухоли. Снижение уровня IL-1β проходило на фоне резкого возрастания IL-1Ra. Возрастание уровня еще одного цитокина из семейства IL-1, IL-18 вместе с ростом уровня

IL-10 позволяет предполагать, по меньшей мере, усиление экспрессии молекул адгезии и усиление метастатического потенциала опухолевых клеток.

Высокий уровень IL-10 и IL-18 у больных с распространенным РЯ до начала ПХТ может служить прогностическим признаком, позволяющим предполагать отсутствие ответа опухоли. Резко сниженный по сравнению с нормой уровень IL-6 до начала ПХТ позволяет предполагать возможность полного или частичного ответа опухоли на ПХТ по схеме AP. Сравнительный анализ динамики на фоне ПХТ показал отсутствие значимых различий показателей изученных цитокинов при обоих способах введения химиопрепаратов.

Заключение

Эффективность НАХТ связана с редокс-статусом Нф и цитокиновым статусом периферической крови, зарегистрированным до начала ПХТ. Значимым для больных с прогрессированием опухоли является повышенное абсолютное и относительное количество Нф со сниженной способностью к продукции АФК. Для больных с отсутствием ответа опухоли значимым является высокий уровень сывороточных IL-10 и IL-18. Для больных с полным или частичным ответом опухоли значимым является сниженный уровень

IL-6. Значимых различий показателей нейтрофильного и цитокинового статуса при обоих способах введения химиопрепаратов не установлено. Показатели сывороточных IL-10, IL-18 и IL-6 могут быть использованы для прогнозирования ответа опухоли на НАХТ по схеме AP.

Работа поддержана гос. заданием МИНОБР-НАУКИ России

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюкова А.А., Мягова Т.Ю., Неродо Г.А., Голотина Л.Ю. Аутомиелохимиотерапия в лечении больных с рецидивами рака яичников // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил.1. – С. 33.
2. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилоцитами // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 11-17.
3. Витвицкий В.М. Использование эритроцитов в качестве переносчиков противоопухолевых препаратов. Автореф. дисс.: д-ра биол.наук. – М., 2014. – 32 с.
4. Горошинская И.А., Голотина Л.Ю., Бирюкова А.А. Влияние аутомиелохимиотерапии на показатели эндогенной интоксикации, свободнорадикального окисления и состояния мембран у больных с рецидивами рака яичников // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 27-31.
5. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии (справочник). – С-Пб.: «Интермедика», 1999. – 656 с.
6. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. – М.: Практическая медицина, 2006. – 503 с.
7. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Симбирцев А.С., Ломатидзе Л.В. Влияние длительного введения синтетического дипептида на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте и in vivo // Иммунология. – 1999. – № 6. – С. 40-43.
8. Сидоренко Ю.С. Экстракорпоральное инкубирование цитостатиков в естественных средах организма новые методы эффективной и щадящей химиотерапии рака // Сибирский онкологический журнал. – 2004. – № 2-3. – С. 35-39.
9. Соснина А.В., Великая Н.В., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2013. – С. 44.
10. Fridman W.H., Teillaud J.L., Saut s-Fridman C. et al. The ultimate goal of curative anti-cancer therapies: inducing an adaptive anti-tumor immune response // Front Immunol. – 2011. – № 2. – P. 66.
11. Gougerot-Pocidallo M.A., el Benna J., Elbim C. et al. Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines // J. Soc. Biol. – 2002. – Vol. 196. – № 1. – С. 37-46.
12. Hannani D., Sistigu A., Kepp O. et al. Prerequisites for the antitumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy // Cancer J. – 2011. – Vol.17. – № 5. – P. 351-358.
13. Ishikawa F., Miyazaki S. New biodefense strategies by neutrophils // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2005. – Vol. 3. – № 3. – P. 226-233.
14. Kaminsky Y.G., Kosenko E.A. Argocytes containing enzyme nanoparticles reduce toxic concentrations of arginine in the blood // Bull. Exp. Biol. Med. – 2012. – Vol. 153. – № 3. – P. 406-408.
15. Knaapen A.M., Gng r N., Schins R.P., et al. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review // Mutagenesis. – 2006. – Vol. 21. – № 4. – P. 225-236.
16. Pei L.H., Wang S.X., Ren X.L. Care of malignant tumors treated with ultraviolet irradiation and oxygenation of autotransfusion. //Zhonghua Hu Li Za Zhi. – 1995. – Vol. 30. – № 4. – P. 212-214.
17. Skorokhod O., Kulikova E.V., Galkina N.M. Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded eythrocytes. //Haematologica. – 2007. – Vol. 92. – № 4. – P. 570-571.

Поступила в редакцию 10.06.2016 г.

I.I. Antoneeva, T.V. Abakumova, S.S. Pirmamedova, T.P. Gening, D.R. Dolgova, S.O. Gening, V.Yu. Shchegoleva

Impact of chemotherapy on the standard solvents and autologous liquid tissues on cytokine status and neutrophils of peripheral blood of ovarian cancer patients

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk

Chemotherapeutic treatment using standard solvents is stopped in every fourth ovarian cancer patient because of significant side effects. The autochemotherapy method alters the pharmacokinetics of the drug, and significantly reduces the frequency and severity of side effects. In order to compare the effects of neoadjuvant chemotherapy using autologous liquid tissues or standard solvents on cytokine status and neutrophils in the peripheral blood we evaluated the number of neutrophils and their ability to generate reactive oxygen species, and levels of interleukin-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-10, IL-18 and TNF- α in 244 primary stage III-IV ovarian cancer patients during chemotherapy according to the AP scheme (cisplatin 75 mg/m², doxorubicin 50 mg/m²) with infusion by standard intravenous method or as autochemotherapy. We established that the effectiveness of chemotherapy was associated with the redox status of neutrophils and cytokine status of peripheral blood, registered prior to neoadjuvant chemotherapy. For patients with tumor progression, increased absolute and relative number of neutrophils with reduced ability to produce reactive oxygen species is significant. For patients with a lack of tumor response, significant are the high levels of serum IL-10 and IL-18. For patients with complete or partial tumor response, significant is the decrease of IL-6 level, compared to the norm. No significant differences in neutrophil and cytokine status in both modes of infusion of chemodrugs have been established. Thus, serum IL-10, IL-18 and IL-6 may be used to predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy according to the AP scheme.

Key words: chemotherapy, autochemotherapy, neutrophils, cytokines, ovarian cancer