

На правах рукописи

ПАРСУНКОВА КЕРМЕН АНАТОЛЬЕВНА

**ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ С
ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМОЙ В ХОДЕ
ВАКЦИНОТЕРАПИИ**

14.01.12-онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

МОСКВА - 2010 г.

Работа выполнена в Учреждение Российской академии медицинских наук Российском онкологическом центре им. Н.Н.Блохина РАМН (директор – академик РАН и РАМН М.И.Давыдов).

Научные руководители:

доктор медицинских наук И.В. Евсегнеева
кандидат медицинских наук И.Н. Михайлова

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор М.В. Киселевский
Доктор медицинских наук, профессор А.К. Голенков.

Ведущая организация:

ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. А.П. Герцена МЗ СР РФ.

Защита состоится «18» марта 2010 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.001.017.02 Учреждения Российской академии медицинских наук Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН (115478, Москва, Каширское шоссе 24).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН

Автореферат разослан «__»_____2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор медицинских наук, профессор

Ю. А. Барсуков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

По мнению многих специалистов-онкологов, биотерапия рака является четвертой модальностью в лечении злокачественных новообразований наряду с хирургическим, лучевым и химиотерапевтическим методами [Якубовская Р.И. 2002].

Исследования на экспериментальных моделях животных и у человека показали, что защита от опухоли осуществляется с помощью различных типов клеток обладающих специфическим и неспецифическим цитотоксическими эффектами, и антител. Многие из клеточных эффектов реализуются через действие растворимых факторов-цитокинов [Козлов В.А. 2004].

Цитокины - группа полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, которые участвуют в формировании и регуляции защитных реакций организма при внедрении патогенов и нарушении целостности тканей, а также в регуляции ряда нормальных физиологических функций. В рамках иммунной системы цитокины осуществляют взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом, действуя в обоих направлениях. Иммунная система подразделяется на два основных типа: опосредованный антителами гуморальный В-клеточный ответ и опосредованный клетками Т-клеточный ответ. Оба ответа стимулируются антигенами. В случае несостоятельности местных защитных реакций цитокины попадают в циркуляцию, и их действие проявляется на системном уровне, что приводит к развитию острофазного ответа на уровне организма [Симбирцев А.С. 2004].

Специфический клеточный иммунный ответ на меланомные антигены классически происходит путем узнавания чужеродных пептидов рецепторами Т-клеток посредством молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) дендритных клеток [Моисеенко В.М. 2001].

Эффективность биотерапии рака может быть усилена путем повышения иммуногенности опухолевых клеток, активации антигенпрезентирующих клеток (АПК) и специфического клеточного

иммунного ответа. Изучение эффективности вакцинного препарата требуется, как минимум, осуществлять оценку реакции гиперчувствительности замедленного типа *in vivo* и, учитывая преимущественное воздействие его на то или иное звено иммунной системы, необходимо предварительно оценивать параметры иммунитета в каждом конкретном случае, в зависимости от назначения препарата и его вида, проводить мониторинг в процессе вакцинотерапии.

Таким образом, актуальным на сегодняшний день является изучение динамики показателей цитокинового профиля (IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, IFN- γ), факторов роста TGF- β_2 , VEGFA, сывороточного маркера меланомы S100, молекулы адгезии CD44 для мониторинга в ходе вакцинотерапии.

Цель работы

Изучение изменения уровней цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии.

Задачи исследования

1. Оценить цитокиновый профиль (IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β_2 , VEGFA) на фоне вакцинотерапии дендритной вакциной.
2. Определить цитокиновый профиль (IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β_2 , VEGFA) на фоне вакцинотерапии генно-инженерной вакцины модифицированной геном tag-7.
3. Определить спектр цитокинов, который можно использовать для иммунологического мониторинга эффективности проводимой терапии.
4. Определить наличие корреляционной связи между динамикой заболевания и уровнем S100 у больных меланомой кожи в ходе вакцинотерапии.
5. Оценить значение изменения уровня CD44 как предполагаемого прогностического маркера при вакцинотерапии.

Научная новизна

Впервые исследован цитокиновый профиль в комплексе с сывороточным маркером, молекулой адгезии и трансформирующим фактором роста у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии.

Выявлены различия в уровнях Th1/Th2-типах цитокинов у пациентов профилактической группы, получающих дендритную вакцину, в зависимости от возраста.

У онкологических больных на фоне прогрессирования выявлена корреляционная связь между уровнями сывороточного маркера меланомы S100, трансформирующим фактором роста TGF β_2 .

Научно-практическая значимость

Определен спектр цитокинов, который можно использовать для иммунологического мониторинга эффективности проводимой терапии.

Изученные серологические показатели рекомендованы для предварительного скрининга пациентов перед вакцинотерапией.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на: 6-th ISREC Conference on Cancer Research (Lausanne, Switzerland 2006); VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва 2007); Научно-практической конференции с международным участием (Элиста 2007); Всероссийской научно-практической конференции «Опухоли кожи и мягких тканей» (Санкт-Петербург 2009); Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва 2009).

Апробация диссертационной работы состоялась на совместной научной конференции с участием лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории медицинской биотехнологии, лаборатории фармакоцитокинетики, лаборатории

клеточного иммунитета НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, отделения биотерапии НИИ КО РОНЦ 24 июня 2009 года.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 21 отечественных и 154 зарубежных источников. Материалы диссертации изложены на 143 страницах машинописного текста и включают 23 таблицы и 8 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-12 (IL-12), интерферон-гамма (IFN- γ), фактор роста эндотелия сосудов (VEGFA), молекулу адгезии sCD44std определяли в сыворотке крови с помощью диагностических тест-систем Bender MedSystems® (Австрия).

Интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-10 (IL-10) определяли в сыворотке крови с помощью диагностических тест-систем ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург).

Трансформирующий фактор роста b2 (TGFb2) определяли в сыворотке крови с помощью диагностических тест-систем DRG Diagnostic (США).

Белок S-100 (S-100A1B и S-100BB формы) определяли в сыворотке крови с помощью диагностической тест-системы CanAg Diagnostics (Швеция).

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолевым лизатом *in vitro*, а также противоопухолевая вакцина на основе аллогенных опухолевых клеток метастатической линии меланомы человека, трансфицированных геном tag7.

В исследование были включены 55 больных, проходивших вакцинотерапию аутологичными дендритными клетками, 15 больных с аллогенной вакциной, 83 больных с меланомой без вакцинотерапии и 13 здоровых доноров.

Больные были разделены на клинические группы:

пациенты с регионарными и/или отдаленными метастазами, получающие вакцину в терапевтическом режиме в виде монотерапии, большинству из них до начала вакцинотерапии проводилось интенсивное лекарственное лечение (химиотерапия, биохимиотерапия, иммунотерапия), на фоне которого отмечено прогрессирование заболевания. Также пациенты с той же распространенностью процесса после радикального хирургического вмешательства, получающие лечение в профилактическом режиме.

На основании уровня сывороточного маркера меланомы S100 пациенты были разделены на 2 группы. Пациенты с уровнем S100 выше нормального значения, принимаемого за $69,4 \pm 38,13$ ng/L, или со значительным (в 2 раза) повышением уровня S100 вскоре после начала вакцинотерапии (2) $n=26$. И пациенты с нормальным и стабильным значением сывороточного маркера S100 (1) $n=29$.

1. В группу (№1) вошли пациенты с меланомой кожи III и IV стадии после радикального хирургического лечения или в полной ремиссии после химио-/иммунотерапии (условно профилактическая группа), $n=29$.
2. Группа (№2) в основном состояла из пациентов с регионарными и/или отдаленными метастазами меланомы (III и IV стадии), а также из пациентов без проявлений заболевания после радикального хирургического лечения по поводу метастатической меланомы (III и IV стадий), у которых вскоре после начала вакцинотерапии развилось прогрессирование болезни (условно терапевтическая группа). Всего включено $n=26$.
3. Группа больных (№3) состояла из пациентов с регионарными и/или отдаленными метастазами меланомы (III и IV стадии), терапевтическая группа с аллогенной вакциной (вакциной, представленной опухолевыми клетками, модифицированными геном tag-7), $n=15$.
4. Контрольную группу (№4) составили больные с меланомой без вакцинотерапии на фоне химиотерапии, $n=83$.
5. В группу №5 вошли здоровые доноры, сопоставимые по возрасту и полу с пациентами исследуемых групп, $n=13$.

Забор крови проводился до вакцинации и перед каждой 5-й вакцинацией. Срок наблюдения 10 недель. Материалом для исследования служила сыворотка крови.

Статистический анализ проводился с использованием статистических непараметрических критериев, не зависящих от характера распределения — точного метода Фишера и критерия “хи-квадрат”, а также традиционно используемого в биомедицинских исследованиях t-критерия Стьюдента для нормально распределенных переменных.

При проведении статистического анализа данных (проверка нормальности распределений показателей и др.) и формирования графиков использованы также статистические пакеты EXCEL 2003 и STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитокины на фоне терапии дендритными клетками.

Первоначально проведенный сравнительный анализ исследуемых показателей свидетельствовал о том, что уровень IL-2 до лечения у всех больных, в группах пациентов, проходивших вакцинацию аутологичными дендритными клетками, относительно контрольных групп получающих аутологичную дендритную вакцину, и в группе больных меланомой без вакцинации был значительно выше по сравнению с группой здоровых доноров (рис. 1).

Содержание IL-12 в профилактической группе у больных было снижено относительно обеих контрольных групп и незначительно отличалось в терапевтической группе.

Значения IFN- γ в двух исследуемых группах были в 3 раза ниже по сравнению со значениями в группе здоровых доноров и сопоставимы по значениям с контрольной группой больных без вакцинации.

Уровень IL-4 в профилактической группе в 3 раза превышал значения по сравнению с группой доноров и был сопоставим с группой больных без вакцинации. Значения данного цитокина в терапевтической группе превышали значения доноров в 1,8 раза, но были в 1,5 раза ниже уровней в группе больных без вакцинации.

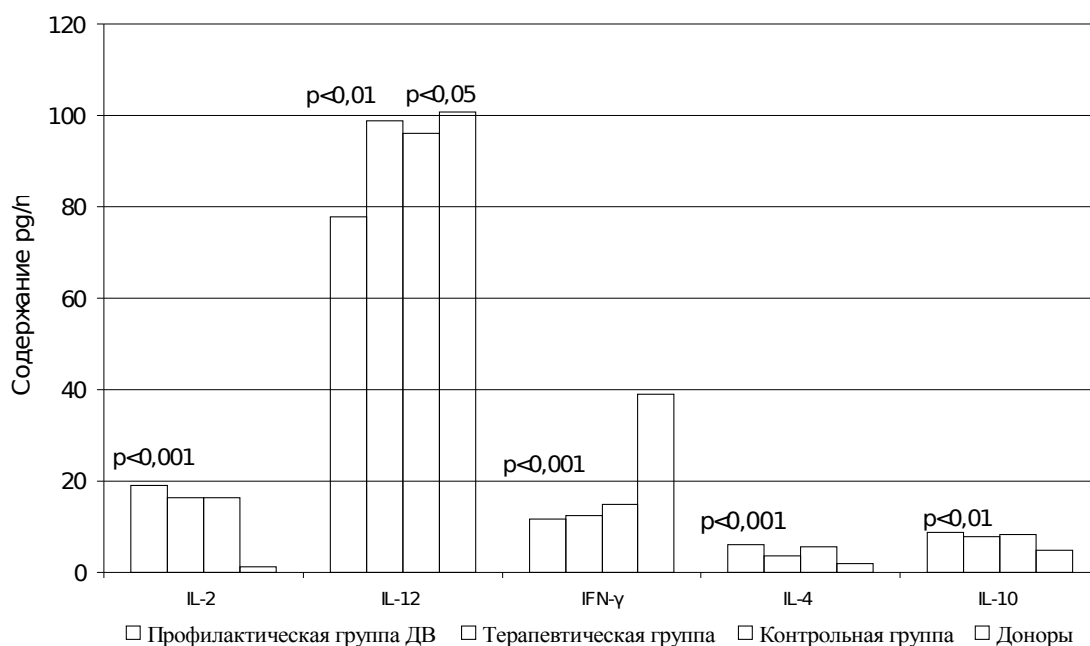


Рисунок 1. Сравнение цитокинового профиля больных до начала лечения и здоровых доноров.

Значения IL-10 в исследуемых группах значительно превышали уровни данного цитокина по сравнению с группой доноров и были сопоставимы с группой больных без вакцинации.

Таким образом, уровни исследуемых цитокинов до вакцинотерапии у пациентов, получающих вакцину с профилактической и терапевтической целью, были различными относительно контрольных групп.

Далее был проведен сравнительный анализ отдельно взятых цитокинов в динамике вакцинотерапии (табл. 1).

В ходе лечения наблюдалось незначительное повышение IL-2 у пациентов в исследуемых группах.

Уровень IL-12 у пациентов профилактической группы был значительно ниже по сравнению со всеми группами и в ходе лечения не менялся. Повышение данного показателя в ходе вакцинации наблюдалось у пациентов терапевтической группы.

Содержание IFN-γ в начале вакцинотерапии у всех пациентов в исследуемых группах было ниже по сравнению с группой здоровых доноров и оставалось неизменным в процессе лечения.

Таблица 1. Распределение цитокинов у больных в процессе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками

Примечание. Значимость различий ($p < 0,05$) при сравнении показателей - до лечения; * * - во время лечения и ($p < 0,001$): * * * - до лечения.

| Содержание (pg/mL, M±m) | Профилактическая группа n =29 | Терапевтическая группа n =26 | Контрольная группа больных без вакцино-терапии n =83 | Доноры n =13 |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|-----------------|
| IL-2 до лечения | 19,04±2,2* | 16,29±2,3* | 16,37±1,5* | 1,13±0,1 |
| во время лечения | 19,64±3,1 | 16,52±2,9 | | |
| IL-12 до лечения | 77,87±6,2 | 98,73±10,9** | 96,13±5,1* | 100,63±9,8 |
| во время лечения | 77,94±6,3* | 104,35±11,6** | | |
| IFN-γ до лечения | 11,65±2,1*** | 12,53±3,04*** | 14,84±1,8*** | 39,13±5,9*** |
| во время лечения | 11,55±2,2 | 11,28±2,2 | | |
| IL-4 до лечения | 6,03±1,9 | 3,62±0,9 | 5,06±0,9 | 1,93 ±0,6 |
| во время лечения | 4,57±1,1 | 4,1±1,4 | | |
| IL-10 до лечения | 8,84±1,6* | 7,75±1,6 | 8,28±0,9 | 4,89 ±0,5* |
| во время лечения | 7,04±1,2 | 7,92±1,8 | | |

Уровень IL-4 у пациентов профилактической группы уменьшился — с 6,03 по 4,57 pg/mL, у пациентов терапевтической группы значение данного показателя незначительно повысилось.

В результате наших исследований в начале вакцинотерапии в профилактической группе также выявлена прямая корреляционная связь между уровнем IL-4 и динамикой заболевания. Коэффициент корреляции по Спирману равен 0,4 ($p=0,02$).

Уровень IL-10 в ходе лечения у больных профилактической группы незначительно уменьшился. Значения данного показателя практически не изменились у пациентов терапевтической группы.

Таким образом, значения IL-2 у больных с диссеминированной меланомой, получающих дендритную вакцину, изначально были различными и незначительно повысились в ходе вакцинотерапии; статистически достоверное повышение средних значений уровня IL-12 наблюдалось в терапевтической группе; уровень IFN-γ в сыворотке крови исследуемых пациентов в ходе вакцинации не изменился; отмеченное снижение уровня IL-4, IL-10 у больных

профилактической группы и повышение средних значений этих цитокинов ходе вакцинотерапии у больных терапевтической группы были статистически незначимы. Необходимо отметить, что в исследуемых группах больных выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем IL-10 и средним количеством дней до прогрессирования заболевания. В профилактической группе коэффициент корреляции по Спирману равен 0,6 ($p=0,00096$) до начала вакцинотерапии и 0,53 ($p=0,004$) в процессе лечения. В терапевтической группе коэффициент корреляции равен 0,4 ($p=0,033$) до начала вакцинотерапии.

Сравнительный анализ содержания цитокинов у больных с дендритной вакциной распределенных по среднему количеству дней до прогрессирования заболевания.

При сравнительном анализе было выявлено, что наибольшее количество дней до прогрессирования заболевания имели большинство пациентов профилактической группы, получающих дендритную вакцину, а у большинства больных терапевтической группы среднее количество дней до прогрессирования заболевания было в 8 раз меньше (табл. 2).

Таблица 2. Распределение пациентов по среднему количеству дней до прогрессирования заболевания

| Группы | Количество пациентов | Дни* |
|--|----------------------|---------------------|
| <i>Профилактическая группа</i> | | |
| 1 подгруппа | 7 | 171,43±23,34 |
| 2 подгруппа | 20 | 823,25±102,9 |
| <i>Терапевтическая группа</i> | | |
| 3 подгруппа | 20 | 109,5±15,28 |
| 4 подгруппа | 6 | 419,17±47,16 |
| Достоверность различий | $P<0,05$ | 1-3; 2-4 |
| | $P<0,01$ | 1-2 |
| | $P<0,001$ | 1-4; 2-3; 3-4 |
| * – среднее количество дней до документально зафиксированной даты метастазирования | | |

Уровни исследуемых показателей у пациентов профилактической группы с наибольшим количеством дней до

прогрессирования заболевания были стабильны, при этом на фоне вакцинотерапии достоверно снижалось значение VEGFA ($p < 0,005$). В терапевтической группе больных с наименьшим количеством дней до прогрессирования заболевания на фоне значительного повышения уровня сывороточного маркера меланомы S100 ($p < 0,005$) отмечалась тенденция к повышению значений IL-12 и TGF β 2.

Сравнительный анализ содержания цитокинов у больных с дендритной вакциной, распределенных по возрасту относительно среднего количества дней до прогрессирования заболевания.

Наши данные показали, что пациенты профилактической группы младше 50 лет имели самое высокое среднее количество дней до документально зафиксированной даты метастазирования заболевания— $861 \pm 161,06$ (табл.3).

В сыворотке крови этой группы больных отмечалось статистически достоверное снижение уровня IFN γ и уменьшение содержания цитокинов клеточного звена иммунитета, при этом наблюдалась тенденция к росту уровня IL-4, что может свидетельствовать об активации Th2-типа иммунитета (рис. 2).

У больных профилактической группы старше 50 лет, наоборот, на фоне снижения IL-4 и достоверного уменьшения уровня IL-10 наблюдался подъем уровней цитокинов клеточного звена иммунитета, что в свою очередь предполагает развитие Th1-типа иммунитета (рис. 3).

Таблица 3. Распределение пациентов, получающих аутологичную дендритную вакцину, по возрасту

| Группы | Количество пациентов | Дни* |
|--|----------------------|---------------------|
| <i>Профилактическая группа</i> | | |
| 1 подгруппа <50 лет | 11 | 861 ± 161,06 |
| 2 подгруппа ≥50 лет | 18 | 532,65 ± 109,08 |
| <i>Терапевтическая группа</i> | | |
| 3 подгруппа <50 лет | 13 | 169,23 ± 33,05 |
| 4 подгруппа ≥50 лет | 13 | 192,69 ± 52,13 |
| Достоверность различий | p<0,05 | 2-4 |
| | p<0,01 | 2-3 |
| | p<0,001 | 1-3; 1-4 |
| * – среднее количество дней до документально зафиксированной даты метастазирования | | |

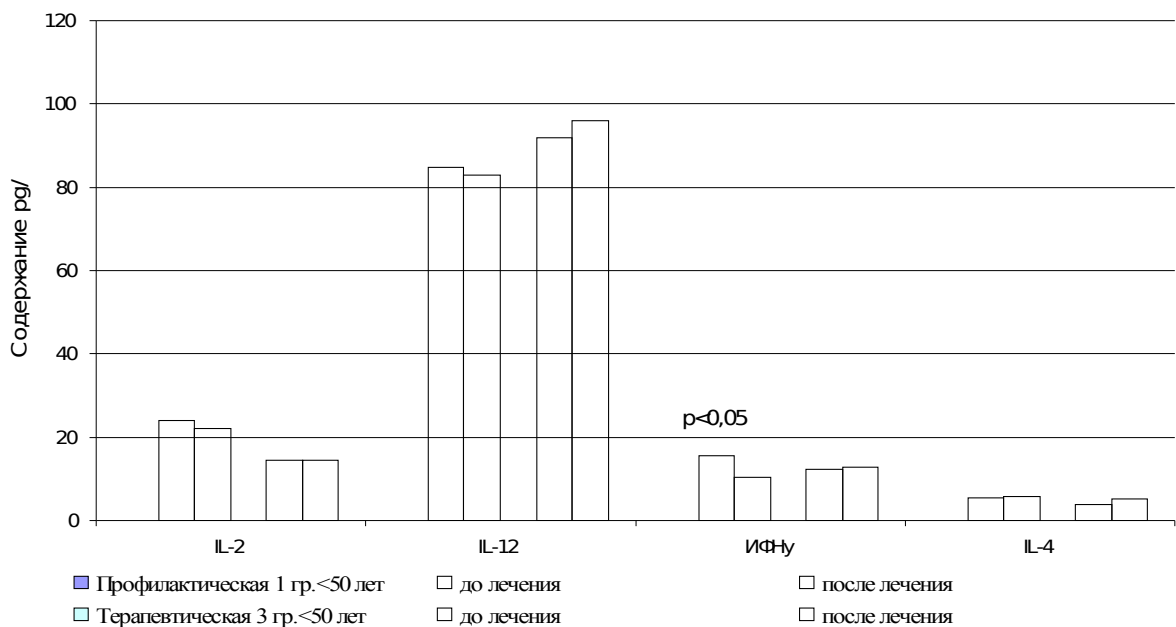


Рисунок 2. Динамика цитокинов у пациентов младше 50 лет.

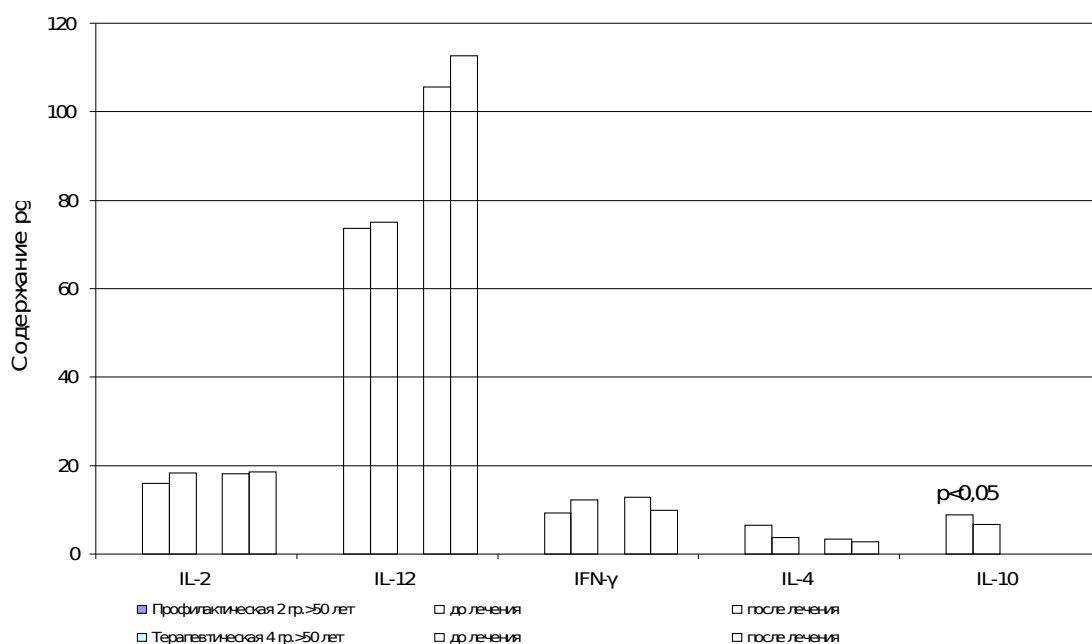


Рисунок 3. Динамика цитокинов у пациентов старше 50 лет.

Уровни S100, CD44, TGF b2 были стабильны, значения VEGFA не менялись в ходе лечения.

Цитокины на фоне терапии аллогенными клетками.

В начале вакцинотерапии содержание IL-2 в сыворотке крови у всех пациентов в исследуемой группе достоверно превышало значения в контрольных группах (табл.4). Уровень этого цитокина в сыворотке крови у больных 1 группы был изначально самым высоким и составил 24,38 pg/ml. В процессе вакцинотерапии аллогенными клетками отмечено достоверное повышение уровня IL-2 с 24,38 до 32,51 pg/ml.

Сывороточные концентрации IL-12 до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, были несколько выше, по сравнению с двумя контрольными группами и составили в среднем 112,25 pg/ml. После лечения отмечено значительное повышение исследуемого цитокина в группе больных с аллогенной вакциной с 112,25 до 173,97 pg/ml.

Содержание IFN-γ в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, было ниже по сравнению с контрольной группой здоровых доноров и превышало

значения контрольной группы без вакцинации. В ходе лечения отмечено снижение уровня интерферона с 34,71 до 26,85 pg/ml.

Таблица 4. Содержание цитокинов в сыворотке крови больных и доноров.

| Группы | Содержание (pg/mL, M±m) | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|---|--------------|
| | IL-2 | IL-12 | IFN-γ | IL-4 | IL-10 |
| 1. Аллогенная | | | | | |
| <i>до лечения</i> | 24,38±3,8* | 112,25±9,7* | 34,71±19,6 | 12,05±2,4* | 10,3±10,3 |
| <i>во время лечения</i> | 32,51±5,7* | 173,97±25,5* | 26,85±11,7 | 8,03±1,1* | 8,54±5,6 |
| 2. Контрольная | 16,37±1,5 | 96,13±5,05 | 14,84±10,7 | 5,6±0,9 | 8,28±8,1 |
| 3. Доноры | 1,13±0,1 | 100,63±9,8 | 39,12±19,7 | 1,93±0,6 | 4,89±1,8 |
| Достоверность различий | p<0,001 1-3; 2-3 p<0,05 1-2 | p<0,05 1-2; p<0,01 1-3 | p<0,001 1-2; 2-3 | p<0,05 1-3 p<0,01 1-2 p<0,001 1-3 | |
| * - p<0,05 в динамике вакцинотерапии. | | | | | |

В результате нашего клинического исследования уровень IL-4 в сыворотке крови до вакцинотерапии в группе больных, получающих аллогенную вакцину, был значительно выше и составил в среднем 12,05 pg/ml. В ходе лечения отмечено значительное уменьшение IL-4 с 12,05 до 8,03 pg/ml.

При анализе содержание IL-10 в сыворотке крови до вакцинотерапии в исследуемой группе больных, отмечено высокое содержание интерлейкина-10 по сравнению с группой здоровых доноров, которое составило в среднем 10,3 pg/ml.

Таким образом, средний уровень IL-12 в группе больных, получающих аллогенную вакцину, изначально был высоким и статистически достоверно повысился в 1,5 раза в процессе вакцинотерапии; уровень IFN-γ был схож с уровнем здоровых доноров, но в процессе вакцинации он снижался; уровень IL-4 был значительно выше по сравнению с контрольными группами и статистически достоверно снижался в ходе вакцинотерапии; в ходе

лечения отмечалось уменьшение содержания IL-10, однако, не имевшее статистически значимого подтверждения.

Сравнительный анализ содержания S100, CD44, TGF b2, VEGFA в группах.

Далее целесообразным представилось сравнить изменения содержания S100, CD44, TGF b2, VEGFA между исследуемыми группами в процессе вакцинотерапии.

Анализ содержания S100 выявил следующее:

В начале вакцинотерапии пациенты исследуемых групп имели высокие значения S100 по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 5), кроме больных в профилактической группе с аутологичной дендритной вакциной.

Таблица 5. Динамика уровня S100 в процессе вакцинотерапии.

| Группы | Содержание (ng/L M±m) | |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------|
| | до лечения | во время лечения |
| 1. Профилактическая группа ДВ | 66,34±6,19 | 89,62±15,13 |
| 2. Терапевтическая группа ДВ | 121,14±16,94* | 314,23±73,52* |
| 3. Аллогенная вакцина | 214,28±39,3* | 365,29±105,7* |
| 4. Контрольная | 117,36±12,49 | 117,36±12,49 |
| 5. Доноры | 69,4±9,84 | 69,4±9,84 |
| Достоверность различий | p<0,05 2-3; 2-5; 1-4 | |
| | p<0,01 1-2; 3-4 | 1-2 |
| | p<0,001 1-3; 3-5 | 1-3 |
| * - p<0,05 в динамике вакцинотерапии. | | |

Уровень исследуемого сывороточного маркера меланомы в этой группе был сопоставим с группой доноров, и составил 66,34 ng/ml.

В ходе лечения в профилактической группе с аутологичной дендритной вакциной уровень сывороточного маркера меланомы

S100 повысился незначительно. В то время как в остальных группах отмечалось значительное статистически значимое его увеличение: в терапевтической группе с дендритной вакциной в 2,6 раз, а в терапевтической группе с аллогенной вакциной в 1,7 раза.

Анализ содержания CD44 выявил следующее:

В начале вакцинотерапии пациенты исследуемых групп имели высокие значения CD44 по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 6).

Таблица 6. Динамика уровня CD44 в процессе вакцинотерапии.

| Группы | Содержание (ng/mL M±m) | |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------|
| | до лечения | во время лечения |
| 1.Профилактическая группа ДВ | 506,69±57,83 | 496,14±41,42 |
| 2.Терапевтическая группа ДВ | 570,04±53,74 | 577,56±46,54 |
| 3.Аллогенная вакцина | 1145,47±128,69* | 1295,43±149,52* |
| 4.Контрольная | 667,1±50,86 | 667,1±50,86 |
| 5.Доноры | 347,67±20,54 | 347,67±20,54 |
| Достоверность различий | p<0,01 2-5; 4- 5 | |
| | p<0,001 1-3; 2-3; 3-4; 3-5 | 1-3; 2-3 |
| * - p<0,05 в динамике вакцинотерапии | | |

Уровень исследуемой молекулы адгезии в профилактической группе пациентов с дендритной вакциной был в 1,5 раза выше группы доноров, но ниже, чем уровень в контрольной группе больных без вакцинации.

Пациенты терапевтической группы с дендритной вакциной также имели изначально высокий уровень CD44 по сравнению с группой здоровых доноров, но он был ниже по сравнению с группой невакцинируемых больных.

Содержание исследуемого показателя в группе пациентов с аллогенной вакциной превышал значения в группе доноров в 3 раза, а в контрольной группе без вакцинации в 1,7 раз.

В ходе лечения в профилактической группе с аутологичной дендритной вакциной уровень CD44 незначительно снизился. В терапевтической группе с дендритной вакциной отмечалось незначительное увеличение данного показателя, а в терапевтической группе у пациентов с аллогенной вакциной наблюдался значительный статистически достоверный подъем уровня CD44 в сыворотке крови.

Анализ содержания VEGFA выявил следующее:

В начале вакцинотерапии уровень VEGFA во всех исследуемых группах был в 2 и более раз выше по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 7).

В ходе лечения у пациентов, получающих аутологичную дендритную вакцину, уровень VEGFA незначительно снизился. Содержание эндотелиального фактора роста в терапевтической группе у больных с аллогенной вакциной в сыворотке крови не менялось в процессе вакцинотерапии.

Таблица 7. Динамика уровня VEGFA в процессе вакцинотерапии.

| Группы | Содержание (pg/mL M±m) | |
|---------------------------------|------------------------|------------------|
| | до лечения | во время лечения |
| 1.Профилактическая группа ДВ | 172,76±33,77 | 163,74±31,17 |
| 2.Терапевтическая группа ДВ | 320,77±106,52 | 309,52±110,05 |
| 3.Аллогенная вакцина | 124,75±27,37 | 123,34±94,92 |
| 4.Контрольная | 182,62±26,15 | 182,62±26,15 |
| 5.Доноры | 74,93±25,17 | 74,93±25,17 |

Анализ содержания TGF b2 выявил следующее: в начале вакцинотерапии пациенты обеих групп с дендритной вакциной имели высокие значения TGF b2 по сравнению с группой больных без вакцинации.

Содержание исследуемого показателя в группе пациентов с аллогенной вакциной было ниже в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой больных без вакцинации (табл. 8).

В ходе лечения в профилактической группе с аутологичной дендритной вакциной уровень TGF b2 незначительно снизился с 1248,28 до 1199,52 pg/ml.

В терапевтической группе с дендритной вакциной отмечалось незначительное увеличение данного показателя с 1165,12 до 1256,07 pg/ml.

В то время как в терапевтической группе с аллогенной вакциной уровень TGF b2 в сыворотке крови повысился с 827,46 до 983,39 pg/ml.

Таблица 8. Динамика уровня TGF b2 в процессе вакцинотерапии.

| Группы | Содержание (pg/mL M±m) | |
|-------------------------------|------------------------|------------------|
| | до лечения | во время лечения |
| 1. Профилактическая группа ДВ | 1248,28±95,48 | 1199,52±64,82 |
| 2. Терапевтическая группа ДВ | 1165,12±105,98 | 1256,07±78,86 |
| 3. Аллогенная вакцина | 827,46±97,82 | 983,39±121,05 |
| 4. Контрольная | 1129,85±62,22 | 1129,85±62,22 |
| Достоверность различий | p<0,05 2-3; 3-4 | |
| | p<0,01 1-3 | |

Таким образом, наблюдается различие средних значений TGF b2 в исследуемых группах, которые меняются в ходе вакцинотерапии.

Заключение

Целью данного исследования было изучение изменения уровней цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии.

В ходе исследования был оценен цитокиновый профиль (IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, IFN-γ, TGF-β₂, VEGF-A) на фоне вакцинотерапии дендритной и аллогенной вакцинами; определена возможность его использования для иммунологического мониторинга эффективности проводимой терапии; оценена корреляционная связь между динамикой заболевания и уровнями белка S100, молекулы адгезии

CD44 у больных с меланомой кожи как предполагаемых прогностических маркерах при вакцинотерапии.

Материалом для исследований послужили образцы сыворотки периферической крови (СК). Количественное определение интерлейкинов, факторов роста и ангиогенеза, онкомаркера и молекулы адгезии производили с помощью иммуноферментного метода (ИФА).

В качестве лечебного препарата применялась противоопухолевая вакцина на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолевым лизатом *in vitro* и аллогенная вакцина, представленная опухолевыми клетками, модифицированными геном tag-7.

В исследование были включены 55 больных проходивших вакцинацию аутологичными дендритными клетками, 15 больных с аллогенной вакциной, 83 больных с меланомой без вакцинотерапии и 13 здоровых доноров.

При проведенном анализе содержания цитокинов в сыворотке крови больных с диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии дендритными клетками получили следующие данные: уровни исследуемых цитокинов до вакцинотерапии у пациентов, получающих дендритную вакцину с профилактической и терапевтической целью, были различными и отличались относительно контрольных групп. Значения IL-2 в исследуемых группах изначально были значительно выше по сравнению с группой доноров. Наблюдавшееся повышение IL-2 происходило в сыворотке крови больных профилактической подгруппы с наименьшим количеством дней до прогрессирования заболевания и в терапевтической подгруппе у лиц с наибольшим количеством дней до прогрессирования заболевания. Уровни IL-12 также в исследуемых группах также изначально были различными. Статистически достоверное повышение средних значений этого цитокина наблюдалось в терапевтической группе и, как выяснилось далее, это повышение произошло у большинства лиц с наименьшим количеством дней до прогрессирования заболевания. Все пациенты имели изначально низкий уровень IFN- γ , и в ходе вакцинации он не изменился. В ходе вакцинотерапии у больных профилактической группы отмечалось снижение уровней IL-4 и IL-10, которое не имело статистически значимого подтверждения. В группах больных с

аутологичной дендритной вакциной выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем IL-10 и средним количеством дней до прогрессирования заболевания. В профилактической группе коэффициент корреляции по Спирману равен 0,6 ($p=0,00096$) до начала вакцинотерапии и 0,53 ($p=0,004$) в процессе лечения. В терапевтической группе коэффициент корреляции равен 0,4 ($p=0,033$) до начала вакцинотерапии. Достоверных данных по изменению содержания IFN- γ и IL-4 при сравнительном анализе по среднему количеству дней до прогрессирования заболевания выявлено не было.

Уровень сывороточного маркера меланомы S100 у пациентов профилактической группы, получающих лечение дендритными клетками, изначально соответствовал референтным значениям, определенным у здоровых доноров и незначительно повышался в ходе лечения. У больных терапевтической группы его средние значения превышали в 2 раза средние уровни S100 по сравнению с профилактической группой в начале вакцинации и значительно повысились в процессе лечения.

При статистическом анализе всей группы больных с дендритной вакциной выявлена обратная корреляционная зависимость между показателями среднего количества дней до прогрессирования заболевания и уровнем S100.

Динамика CD44 и TGF b2 имела разнонаправленный характер. Значимые изменения произошли в терапевтической подгруппе у больных с наименьшим количеством дней до прогрессирования заболевания, уровень CD44 и TGF b2 в этой подгруппе увеличился в 1,1 раза в процессе вакцинотерапии.

Полученные данные наглядно продемонстрировали, что пациенты профилактической группы младше 50 лет с аутологичной дендритной вакциной имели самое высокое среднее количество дней до прогрессирования заболевания и у них снизились уровни цитокинов клеточного звена иммунитета, при этом отмечалась тенденция к росту уровня IL-4, что может свидетельствовать об активации Th2-типа иммунитета. У лиц старше 50 лет, наоборот, на фоне снижения IL-4 и статистически достоверного снижения IL-10 наблюдался подъем уровней цитокинов клеточного звена иммунитета, что в свою очередь предполагает развитие Th1-типа иммунитета.

При проведенном анализе содержания цитокинов в сыворотке крови больных с диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии аллогенными клетками получили следующие данные: уровни исследуемых цитокинов до вакцинотерапии у пациентов, получающих аллогенную вакцину с терапевтической целью, были значительно выше по сравнению с контрольными группами (исключение составлял IFN- γ , уровень которого был сопоставим с группой доноров); значение IL-2 у пациентов с аллогенной вакциной достоверно повысилось, а средний уровень IL-12, который изначально был высоким, увеличился в 1,5 в процессе вакцинотерапии; уровень IFN- γ в процессе вакцинации статистически достоверно снижался; отмечалось достоверное снижение экспрессии IL-4, а наблюдаемое уменьшение экспрессии IL-10 в процессе вакцинотерапии не имело статистически значимого подтверждения. Значительное повышение экспрессии IL-2, IL-12 в ходе вакцинации наблюдается во всех возрастных подгруппах у больных с аллогенной вакциной. Изменение содержания IFN- γ , рассмотренные по возрастному признаку, носили разнонаправленный характер. Наибольшее снижение данного показателя наблюдается у лиц старше 50 лет с аллогенной вакциной. Значительное снижение экспрессии IL-4 в ходе вакцинации наблюдается во всех возрастных подгруппах у больных с аллогенной вакциной.

Независимо от возраста пациентов, наблюдалось повышение уровня S100, на фоне которого повышались уровни CD44 и TGF b2 у больных старше 50 лет, получающих лечение аллогенными клетками.

При сравнительном анализе содержания S100, CD44, TGF b2, VEGFA относительно всех групп в терапевтической группе с аллогенной вакциной наблюдался значительный подъем уровней S100, CD44, TGF b2 при этом уровень VEGFA в сыворотке крови не менялся, но достоверности различий для средних значений данного признака выявлено не было.

Выводы

1. Выявлено низкое содержание IL-12, IFN- γ и напротив высокие уровни IL-4 и IL-10, которые свидетельствуют о существующем дисбалансе Th1/Th2-типа иммунной системы у больных

- диссеминированной меланомой, получающих лечение аутологичной дендритной вакциной.
2. Обнаружено снижение уровней IL-2, IL-12, IFN- γ (Th1-типа цитокинов) и повышение уровня IL-4 (Th2-типа цитокинов) на фоне вакцинотерапии у больных профилактической группы младше 50 лет с наибольшим количеством дней до прогрессирования заболевания, свидетельствующее о развитии гуморального В-клеточного ответа.
 3. Выявлено повышение уровней IL-2, IL-12, IFN- γ (Th1-типа цитокинов) и снижение уровня IL-4 (Th2-типа цитокинов) в процессе вакцинотерапии у пациентов профилактической группы старше 50 лет, получающих лечение дендритными клетками, которое свидетельствует о развитии клеточного иммунного ответа.
 4. Обнаружена прямая корреляционная зависимость между средним количеством дней до прогрессирования заболевания и уровнем IL-10 в профилактической и терапевтической группах больных, получающих лечение аутологичной дендритной вакциной: с увеличением продолжительности жизни пациентов возрастает уровень IL-10.
 5. Обнаружена обратная корреляционная связь между средним количеством дней до прогрессирования заболевания и уровнями S100, TGF β 2, VEGFA у больных диссеминированной меланомой, получающих аутологичную дендритную вакцину: увеличение уровней исследуемых показателей сопровождается снижением продолжительности жизни больных.
 6. У пациентов на фоне терапии генно-инженерной вакцины, из опухолевых клеток, трансфицированных геном *tag-7*, повышались уровни IL-2, IL-12 и снижались IL-4 и IL-10, что свидетельствует об активации Th1-типа иммунного ответа.
 7. Выявлена обратная корреляционная связь между динамикой заболевания и уровнем сывороточного маркера меланомы S100: снижение продолжительности жизни пациентов сопровождается повышением уровня сывороточного маркера меланомы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Михайлова И.Н., Бурова О.С., Лукашина М.И., Морозова Л.Ф., Утяшев И.А., Петенко Н.Н., Барышников К.А., Иванов П.В., **Парсункова К.А.**, Черемушкин Е.А., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. «Вакциноterapia диссеминированной меланомы геномодифицированными клетками» – Русский журнал Материалы 15-й Международной конференции «СПИД, рак и общественное здоровье» Санкт-Петербург т10, т2, 22-26 мая 2006г, стр.25.
2. Mikhaylova I.N., Burova O.S., Lucashina M.I., Morozova L.F., Utyashev U.A., Petenko N.N., Barishnikov K.A., Ivanov P.V., **Parsunkova K.A.**, Cheremushkin E.A., Demidov L.V., Barishnikov A.U. «Gene modified tumor therapy of advanced melanoma» – 8-th International Biological Therapy of Cancer – June 21-24, 2006, Dresden.
3. Mikhaylova I.N., Chkadua C.Z., Borunova A.A., Petenko N.N., **Parsunkova K.A.**, Balatskaya N.V., Cheremushkin E.A., Titov K.S., Krasnova B.K., Kadagidze Z.G., Demidov L.V., Barishnikov A.U «Autologous dendritic cell based of melanoma»» – 8-th International Biological Therapy of Cancer – June 21-24, 2006, Dresden.
4. Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З., **Парсункова К.А.**, Краснова Л.Б., Кузьмин С.Г., Ворожцов Г.Н., Барышников А.Ю. «Растворимая форма CD44 в сыворотке пациентов с диссеминированной меланомой кожи» – Онкология сегодня. Успехи и перспективы. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Труды КОД МЗ РТ. Том 9. Казань 2006 г., стр. 166-167.
5. Mikhaylova I.N., Demidov L.V., Petenko N.N., **Parsunkova K.A.**, Balatskaya N.V., Krasnova L.B., Kuzmin S.G. «Serum CD44 in advanced melanoma patients» – 6-th ISREC Conference on Cancer Research , October 11-13, 2006, Lausanne, Switzerland.
6. Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Петенко Н.Н., Бурова О.С., **Парсункова К.А.** и др. «Использование БАД «кордицепс новый рецепт» у больных диссеминированной меланомой кожи на фоне химиотерапии» – Российский биотерапевтический журнал, 2006, т.5, №4, стр.38-42.

7. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З., Вишнякова Л.Ю., Огородникова Е.В., Черемушкин Е.А., Титов К.С., Хатырев С.А., Харатишвили Т.К., **Парсункова К.А.**, Алиев М.Д., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. «Вакциноterapia метастатической меланомы с использованием дендритных клеток: клиническое исследование I/II фазы» – Российский биотерапевтический журнал, 2007, №2, стр.39-43.
8. **Парсункова К.А.**, Михайлова И.Н., Краснова Л.Б., Кузьмин С.Г., Ворожцов Г.Н., Барышников А.Ю. «Динамика уровней ИЛ-2 и ИФН γ в сыворотке крови при диссеминированной меланоме» – Российский биотерапевтический журнал, Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», 24-26 марта 2007г., Москва, стр.61.
9. **Парсункова К.А.**, Михайлова И.Н., Евсегнеева И.В., Гандурина И.А., Краснова Л.Б., Кузьмин С.Г., Ворожцов Г.Н., Петенко Н.Н., Барышников А.Ю. «Динамика уровней цитокинов в сыворотке крови при диссеминированной меланоме» – Актуальные вопросы онкологии. Материалы научно-практической конференции с международным участием, 23-24 апреля, 2007 г., Элиста, стр.30-31.
10. Балацкая Н.В., **Парсункова К.А.**, Гольдина Н.А., Гандурина И.А., Краснова Л.Б., Кузьмин С.Г., Ворожцов Г.Н., Петенко Н.Н., Михайлова И.Н., Барышников А.Ю. «Состояние антиоксидантной системы у больных меланомой кожи» – Актуальные вопросы онкологии. Материалы научно-практической конференции с международным участием, 23-24 апреля, 2007 г., Элиста, стр.31-33.
11. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Бурова О.С., **Парсункова К.А.**, Балацкая Н.В., Гольдина Н.А., Гандурина И.А., Сомонова О.В., Манджуга А.В., Краснова Л.Б., Кузьмин С.Г., Ворожцов Г.Н., Демидов Л.В. «Применение БАД «Высший Линчжи» у больных диссеминированной меланомой кожи на фоне химиотерапии» – Российский биотерапевтический журнал, 2008, №3, стр.80-85.
12. Михайлова И.Н., **Парсункова К.А.**, Евсегнеева И.В., Краснова Л.Б., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З., Черемушкин Е.А.,

Караулов А.В., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. «Динамика цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками» – Иммунология, 2010, №3, стр.131-135.

13. **Парсункова К.А.**, Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. «Цитокиновый профиль на фоне вакцинотерапии у больных диссеминированной меланомой» – Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Опухоли кожи и мягких тканей», 3-4 сентября 2009г., Санкт-Петербург, стр.31-34.
14. Михайлова И.Н., **Парсункова К.А.**, Евсегнеева И.В., Краснова Л.Б., Барышников К.А., Черемушкин Е.А., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Караулов А.В., Киселев С.Л., Демидов Л.В., Барышников А.Ю. «Динамика цитокинов у больных с диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии аллогенными опухолевыми клетками» – Российский биотерапевтический журнал, 2010, №4, 8 том, стр. 13-16.
15. **Парсункова К.А.**, Михайлова И.Н., Евсегнеева И.В., Петенко Н.Н., Караулов А.В., Барышников А.Ю., Барышников К.А., Чкадуа Г.З., Морозова Л.Ф., Бурова О.С., Ворожцов Г.Н. «Сравнительный анализ содержания S100, CD44, TGF b2, VEGFA в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой на фоне вакцинотерапии» – Материалы VI Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», 10-11 ноября 2009г., Москва, стр.178-181.