Медицинская Иммунология
2006, Т.8, № 4, стр 561-566
© 2006, СПб РО РААКИ

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И ИНТЕРФЕРОНА-АЛЬФА В КОМБИНАЦИИ С СЕАНСАМИ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ НА ЭТАПАХ ИНТЕНСИВНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ С ДАЛЕКО ЗАШЕДШИМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Исмаил-заде Р.С.[1], Белевцев М.В.,[1] Потапнев М.П.[2], Савицкий В.П.[1], Жаврид Э.А.[3], Буглова С.Е.[1]

[1] *Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии МЗ, Беларусь;*

[2] *Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии МЗ, Беларусь;*

[3] *НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова МЗ, Беларусь*

Резюме. Изучено влияние препаратов цитокинов интерлейкина-2 (Ронколейкин) и интерферона α 2b (Интрон А) на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у детей с распространенными формами злокачественных опухолей на этапах интенсивной химиотерапии с сеансами общей гипертермии. Показано, что применение Интрона А на фоне термохимиотерапии способствует восстановлению абсолютного числа лимфоцитов периферической крови без существенного влияния на их субпопуляционный состав. Применение Ронколейкина сопровождалось более выраженной лимфопенией и повышением содержания активированных ($CD25^+$, $HLA\text{-}DR^+$) Т клеток по сравнению с использованием Интрона А. У больных, принимавших Ронколейкин или Интрон А, отмечено разнонаправленное изменение соотношения $CD4^+/CD8^+$ Т клеток в сторону увеличения числа $CD4^+$ Т клеток под действием Ронколейкина. Сделан вывод о разных механизмах иммуномодулирующего действия препаратов интерлейкина 2 и интерферона α 2b у онкологических больных, получающих комплексную химиобиотерапию с общей гипертермией.

Ключевые слова: интерлейкин-2, интерферон- альфа, общая гипертермия, опухоли у детей.

Ismail-zade R.S., Belevtsev M.V., Potapnev M.P., Savitskiy V.P., Zhavrid E.A., Buglova S.E.

INTERLEUKIN-2 – AND INTERFERON-ALPHA- INDUCED CHANGES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN CHILDREN WITH ADVANCED MALIGNANCIES, TREATED WITH CHEMOTHERAPY AND WHOLE BODY HYPERTHERMIA

Abstract. The effect of cytokine preparations (Interleukin-2/IL-2/Proleukin and interferon-alpha/IFN-α 2b/ Intron A) on immune cell subpopulations has been studied in the children suffering with advanced malignancies during intensive chemotherapy cycles combined with whole body hyperthermia (thermochemotherapy). It was shown that IFN-α 2b promotes recovery of peripheral lymphocyte counts in the patients. However, no sufficient changes were observed for the lymphocyte subpopulations. Furthermore, more profound lymphopenia along with increased contents of activated ($CD25^+$, $HLA\text{-}DR^+$) T cells occurs in a group of children treated with IL-2, as compared to the patients who

Адрес для переписки:
Исмаил-заде Рейман Садыкович,
Пос. Лесной, Минский район,
223040, Беларусь
Тел. (375) 17-202-48-17,
факс (375) 17-202-42-22.
E-mail: reiman1955@mail.ru

received IFN-α 2b. Besides that, some differential effects upon the $CD4^+/CD8^+$ T-cell ratios were observed in the patients treated with Proleukin or Intron A, with a tendency to increase in $CD4^+$ T-cells for the patients treated with IL-2. It was concluded that differential immunomodulatory mechanisms mediate the effects of IL-2 and IFN-α 2b in the patients with malignancies undergoing combined chemobiotherapy with whole-body hyperthermia. ***(Med. Immunol., 2006, vol.8, № 4, pp 561-566)***

В клинической онкологии продолжается интенсивный поиск новых терапевтических подходов для повышения эффективности лечения больных с далеко зашедшими и рецидивными формами злокачественных опухолей. Большие надежды возлагаются в этом плане на применение биотерапии, в том числе гипертермии [4, 5, 7, 8]. Влияние гипертермии на трансмембранный перенос и метаболизм может привести к преодолению лекарственной устойчивости и повышению иммуногенности опухоли [6]. Несмотря на многочисленные исследования по использованию общей гипертермии (ОГ), механизмы иммуномодулирующего эффекта ОГ пока остаются недостаточно изученными и предполагают как прямое воздействие на иммунокомпетентные клетки, так и на их взаимодействие с опухолевой тканью [3, 12].

Иммунологические сдвиги при ОГ зависят от температурного режима и продолжительности гипертермии. После «теплового удара» у больных наблюдается достоверное снижение $CD4^+$ Т-лимфоцитов и ЕК клеток [16]. Непродолжительная (75-110 мин) и умеренная (+39,5°С) ОГ у людей не изменяет абсолютное количество периферических лимфоцитов после нагревания, но значительно уменьшает их относительное количество за счет увеличения нейтрофилеза [2]. По данным одних авторов, после ОГ у больных отмечено снижение $CD4^+$ Т-лимфоцитов и повышение ЕК клеток [9, 14, 15]. По другим данным - снижение ЕК клеток [9]. В работе Atanackovic подтверждено повышение количества ЕК клеток и достоверный рост периферических цитотоксических Т-клеток после ОГ, при этом достоверное изменение CD4 Т-лимфоцитов не было отмечено [10]. В нашей предыдущей работе отмечены резкое снижение всех основных субпопуляций лимфоцитов, тенденция к восстановлению баланса $CD4^+/CD8^+$ Т клеток, повышение экспрессии рецепторов к интерлейкину-2 (IL-2), увеличение доли лимфоцитов, находящихся в ранней стадии апоптоза после лечения, включающего сеансы ОГ, химиотерапию и биотерапию с использованием IL-2 [1]. Согласно данным Dieing A. et. al., ОГ в режиме +41,8°С вызывает апоптотическую гибель субпопуляций лимфоцитов [12]. После ОГ в эксперименте на собаках (42,3°С) на 8 день снижался уровень $CD8^+$ и $CD5^+$ Т-лимфоцитов. Уровень $CD5^+$ В-лимфоцитов уменьшался в меньшей степени, а $CD4^+$ Т-клеток - не изменялся. При этом данных за развитие условно-патогенной инфекции не было [19]. В эксперименте на собаках после ОГ (42,3°С, 90 мин) отмечалась лимфопения. При этом $CD5^+$ Т-лимфоциты были более чувствительны к ОГ, чем sIg^+ В клетки. В пределах популяции Т-клеток $CD8^+$ клетки были более чувствительны к гипертермии, чем $CD4^+$клетки [20]. Есть предположение, что увеличение уровней $CD8^+$ лимфоцитов и ЕК-клеток зависит от увеличения синтеза соматотропина при ОГ [11]. Введение соматостатина во время ОГ снижало выраженность нейтрофилеза. При этом не наблюдалось изменения числа ЕК, $CD3^+$ клеток в периферической крови [17]. ОГ значительно влияет также на параметры гуморального иммунитета. После ОГ (+41,8°С) достоверно возрастали уровни G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF в сыворотке крови. Содержание С- реактивного белка, GM-CSF, интерферона-гамма, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-7, IL-11, IL-12, M-CSF, MIP-1α существенно не изменилось [22]. Уменьшение миелосупрессии при проведении химиотерапии после гипертермии объясняют увеличением концентрации IL-1β, IL-6, и TNFα в периферической крови, вызывающих индукцию IL-3 и GM-CSF в костном мозге [18]. Определено также, что ОГ (+41,8°С, 60 минут) стимулирует нарастание уровней в сыворотке растворимых рецепторов фактора некроза опухоли (sTNF-RI и sTNF-RII) [21].

Биологические механизмы воздействия ОГ с химиотерапией на иммунную систему а также роль дополнительного применения цитокинов изучено мало.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния на иммунную систему онкологических больных сеансов общей гипертермии с химиотерапией и дополнительного введения цитокинов интерлейкина-2 или интерферона-альфа.

Материалы и методы

Пациенты

Многокомпонентное лечение с использованием ОГ проводилось у 28 детей с далеко зашедшими злокачественными опухолями (III-IV стадии), поступивших для обследования и лечения в Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (директор – профессор О.В.Алейникова) в период с января 2000 по декабрь 2004 года. Средний возраст детей составил 12 лет (6-17 лет). У 11 детей была диагностирована саркома мягких тканей, у 4 - остеогенная саркома, у 3 - гепатобластома, у 3 - рецидивные формы опухоли Вильмса, у 2 - почечно-клеточный рак и у 5 больных - другие злокачественные опухоли.

Схема терапии

Все сеансы ОГ осуществлялись на установках “Яхта-5”(г.Фрязино, Россия) и “Птичь“(Беларусь) с генератором, работающим с частотой 13,56 Мгц , под общим комбинированным эндотрахеальным закисно-кислородным наркозом в сочетании с нейролептаналгезией. Интервалы между циклами лечения составили 3-4 недели. Для усиления противоопухолевого эффекта термохимиотерапии больным вводили 40% раствор глюкозы в дозе 3,25 мл/кг в течение первых 30 минут, затем 2,5 мл/кг/ч. Уровень гипергликемии во время сеанса составлял 20-25 ммоль/л.

Во время сеансов ОГ проводили химиотерапию в зависимости от типа злокачественной опухоли и ранее проведенной полихимиотерапии. При этом использовали: доксорубицин (40-50 мг/м^2) , карбоплатин (400 мг/м^2) , винкристин (1,5 мг/м^2) + циклофосфан (500-1000 мг/м^2), дактиномицин (0,5-1,0 мг/м^2), этопозид (100-150 мг/м^2), мелфалан (15-25 мг/м^2) ифосфамид (3гр/м^2). Термоэкспозиционный режим составил 41,8-43°С, 140-180 мин.

У 10 больных дополнительно к сеансам ОГ и химиотерапии проводилась цитокинотерапия рекомбинантным IL-2 человека (Ронколейкин, “Биотех”, С.Петербург). Ронколейкин вводился в дозе 0,5-1,0 х 10^6 ЕД/м^2 в виде 4-часовой инфузии к концу сеанса ОГ и в последующие дни (всего 3 инфузии).

У 8 больных цитокинотерапия к сеансам термохимиотерапии проводилась с использованием рекомбинантного интерферона-α2b (Интрон-А) по 3 млн ед/м^2, п/к, 3 дня до сеанса ОГ, перед сеансом и 3 дня после нее (в течение 7 дней). Каждому больному было проведено от 2 до 4 курсов лечения с использованием ОГ и химиотерапии.

Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови онкологических больных

Периферическую кровь больных для исследования брали накануне и спустя 1-2 сутки после сеанса термохимиоцитокинотерапии. Для характеристики состояния лимфоцитов изучали их субпопуляционный состав. Контрольную группу составили 46 здоровых детей аналогичного возраста.

Иммунофенотипическую характеристику лимфоцитов периферической крови проводили с цельной кровью. Для идентификации субпопуляций лимфоцитов использовали метод прямой иммунофлюоресценции с использованием панели моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (США). Определение процентного содержания CD3$^+$ Т-, CD19$^-$ В-клеток, (CD16$^+$CD56$^+$CD3$^-$) естественных

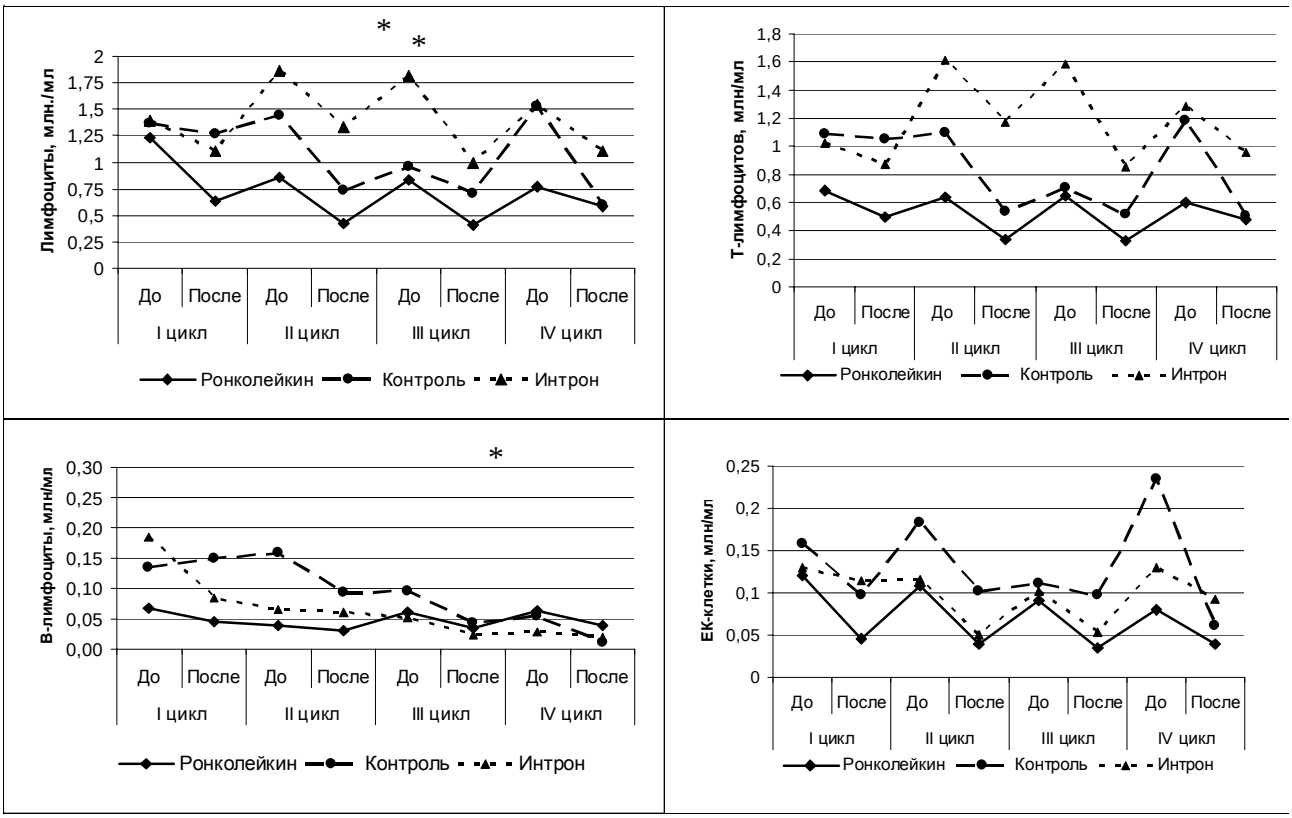

Рис. 1. Сравнительная характеристика изменения абсолютного содержания Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и естественных киллеров на этапах общей гипертермии на фоне химиотерапии в группах детей с солидными опухолями, использующих Ронколейкин и Интрон А. * p<0,05.

киллеров, $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций Т-лимфоцитов, активированных $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ Т-лимфоцитов, а также $CD4^+$ Т-клеток-хелперов, экспрессирующих рецепторы к IL-2 ($CD25^+$). Для маркеров CD25 и CD95 регистрировали также показатель средней интенсивности флуоресценции (СИФ), отражающий плотность экспрессии молекул на клеточной мембране. Определение проводили методом проточной цитофлуориметрии на аппарате FACS-can, (фирмы Becton Dickinson) [13].

Данные, полученные в ходе исследований, обрабатывали в программе Excel с определением средних значений и ошибки средней. Сравнение вариационных рядов проводили с применением программы Statistica 6.0. Использовали следующие критерии оценки достоверности различий: Mann Whitney U test, Wilcoxon matched pairs test, t-test.

Результаты и обсуждение

Для сравнительной оценки иммуномодулирующего действия Ронколейкина и Интрона А на этапах ОГ с применением полихимиотерапии исследовали ряд показателей клеточного иммунитета до и после сеансов ОГ в трех группах онкологических больных: принимавших Ронколейкин (n=10) или Интрон А (n=8). Контрольную группу составляли больные с высоко злокачественными солидными опухолями, иммунологическое обследование которых проводили до и после сеансов ОГ без введения в схемы лечения Ронколейкина и Интрона (10 больных).

Результаты, характеризующие динамику исследованных иммунологических показателей разных групп больных, представлены на рис.1. При рассмотрении изменения абсолютного содержания лимфоцитов видно выраженное иммуносупрессивное действие проводимой ОГ на каждом из этапов лечения в комбинации с химиотерапией независимо от дополнительного введения цитокинов. В интервалах между циклами наблюдалась тенденция к восстановлению абсолютного содержания лимфоцитов. Тем не менее, проведение каждого следующего сеанса ОГ снова оказывало супрессивное действие. Во всех трех исследуемых группах содержание В-лимфоцитов независимо от сопутствующего назначения цитокинов резко падало до минимальных значений и сохранялось на уровне почти нулевых показателей до конца всех циклов лечения. Отмечается также общая тенденция к циклическому снижению содержания ЕК в периферической крови исследуемых групп.

Рассматривая иммуномодулирующее действие Ронколейкина на этапах ОГ в комбинации с химиотерапией, можно отметить следующее. Иммуномодулирующий эффект Ронколейкина проявляется, в первую очередь более выраженной лимфопенией, а также на уровне субпопуляционного состава лимфоцитов, причем степень различия возрастает к завершающим циклам ОГ. При использовании Ронколейкина процент Т-лимфоцитов остается стабильным в обеих группах больных, получавших цитокины. В то же время баланс субпопуляций $CD4^+$/

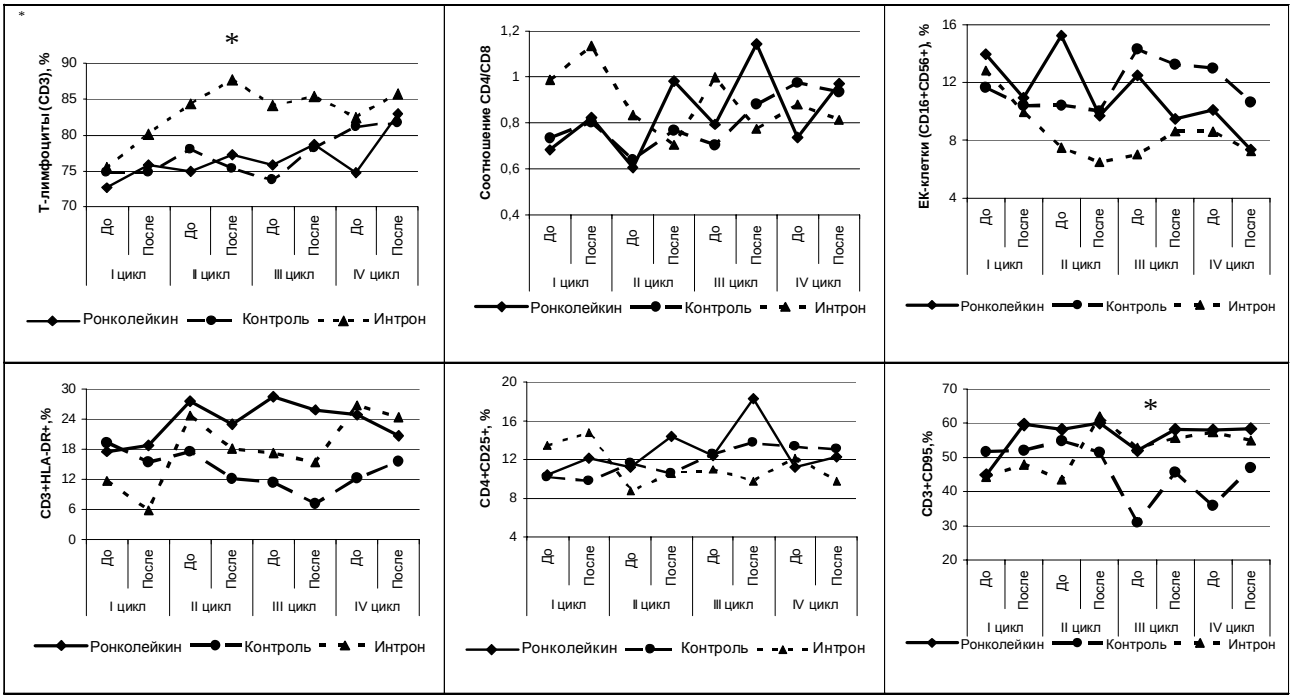

Рис.2. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов на этапах общей гипертермии на фоне химиотерапии в группах детей с солидными опухолями, использующих Ронколейкин и Интрон А. * $p<0,05$.

$CD8^+$ Т-лимфоцитов различается в сторону увеличения числа $CD4^+$ в группе, применяющей Ронколейкина.

Отношение содержания (%) $CD25^+CD4^+$ Т-клеток хелперов, экспрессирующих рецепторы к IL-2, к содержанию (%) $CD3^+CD4^+$ Т-клеткам хелперам характеризуется одинаково устойчивой тенденцией к увеличению, особенно в группе больных, получавших Ронколейкин. При этом модулирующее действие Ронколейкина на экспрессию своих рецепторов практически не проявляется в повышении плотности (количества) маркера (значение СИФ) на поверхности клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что Ронколейкин, применяемый в сочетании с ОГ и химиотерапией, обладает умеренно выраженным иммуномодулирующим действием, направленным преимущественно на поддержание активированных $CD4^+$ Т-клеток.

Оценку иммуномодулирующего эффекта Интрона А проводили на этапах ОГ в комбинации с химиотерапией по изменению показателей клеточного иммунитета, применяя сравнительный анализ с исследованными показателями в группе пациентов, в которой применялась ОГ в комбинации с химиотерапией без введения цитокинов (рис.2). Применение Интрона А способствует быстрейшему восстановлению (поддержанию) абсолютного числа лимфоцитов, в том числе Т-лимфоцитов на этапах применения ОГ в комбинации с химиотерапией. Применение данного цитокина не вызывало значимых изменений соотношения CD4/CD8 лимфоцитов, хотя можно отметить небольшую тенденцию к увеличению числа CD8 клеток при применении Интрона А. Выраженного иммуномоделирующего действия на экспрессию маркеров активации ($CD4^+$ $CD25^+$ и $CD3^+$HLA-DR) на лимфоцитах Интрон А практически не оказывал. Полученные данные свидетельствуют о том, что Интрон А, применяемый в сочетании с ОГ и химиотерапией, обладает выраженным «иммуномосохранным» действием по отношению ко всем лимфоидным клеткам и практически не влияет на их субпопуляционный состав.

Сопоставляя результаты иммунологических исследований, проведенных в группах онкологических больных с применением Ронколейкина и Интрона А (рис.2), можно отметить, что применение Интрона А способствует быстрейшему восстановлению абсолютного числа лимфоцитов, но никак не влияет на их субпопуляционный состав. В свою очередь, в группе с Ронколейкином по сравнению с группой, в которой применялся Интрон А, достоверно более выражена степень снижения содержания лимфоцитов периферической крови, В-лимфоцитов в динамике лечения. Кроме этого, в сравниваемых группах отмечается разнонаправленное изменение соотношения $CD4^+/CD8^+$ в сторону увеличения числа $CD4^+$ клеток в группе больных, применяющих Ронколейкин. Изменение экспрессии активационных маркеров $CD25^+$ и HLA-DR на Т-лимфоцитах более выражено при введении в протокол лечения Ронколейкина.

По нашему представлению, такие изменения являются следствием суммарного действия как самой процедуры ОГ, так и цитостатических препаратов, чувствительность клеток к которым повышается под воздействием экстремальной температуры.

Список литературы

1. Буглова С.Е., Исмаил-заде Р.С., Савицкий В.П., Жаврид Э.А., Белевцев М.В., Потапнев М.П. Иммуномодулирующий эффект термохимиотерапии с ронколейкином при лечении далеко зашедших злокачественных опухолей у детей // Иммунология, 2003. - N2. - С. 107-110.

2. Зеленина Н.В., Андреева Л.И., Горянчук В.В. Действие непродолжительного умеренного нагревания организма здорового человека на периферические лимфоциты // Цитология, 2000. - №42 (2). - С.166-169.

3. Исмаил-заде Р.С., Буглова С.Е., Белевцев М.В. Иммунный статус больных с распространенными злокачественными опухолями при лечении с использованием общей гипертермии // Материалы международного научного форума " Онкология на рубеже XXI века. Возможности и перспективы". - Москва, 1999. - С. 144-145.

4. Исмаил-заде Р.С., Буглова С.Е., Потапнев М.П., Сачивко Н.В., Семенов А.С., Рудько В.С., Шман Т.В., Жаврид Э.А. Термохимиотерапия при рефрактерных и далеко зашедших злокачественных опухолях у детей// Вопр. онкол. - 2002. - №48(3). - С. 351-355.

5. Карев И.Д., Родина А.А., Карева А.И. Общая гипертермия (42,0-43,4°С) в лечении больных с саркомами мягких тканей // Рос. онкол журн. - 2003. - N 6. - С. 29-32.

6. Курпешов О.К., Цыб АФ., Мардынский Ю.С., Бердов Б.А. Механизмы развития и пути преодоления химиорезистентности опухолей // Рос. онкол. журнал. - 2003. - N 3. - С.50-53.

7. Kiss C., Kiss M., Szegedi I., Arvai K., Toth J., Olah E. Interferon-alpha therapy in children with malignant disease: clinical experience in twenty-four patients treated in a single pediatric oncology unit // Med. Pediatric Oncol. - 2002. - Vol.39. - P.115-119.

8. Oldham R.K. Principles of Cancer Biotherapy // Kluwer Academic Publishers. - 2003. - P. 230 c.

9. Ahlers O., Boehnke T., Kerner T., Deja M., Keh D., Loffler J. Induced hyperthermia causes significant changes in lymphocytes // Crit.Care. - 1998. - Vol.2 (02) (Abstract).

10. Atanackovic D., Nierhause A., Neumeier M., Hossfeld D.K., Hegewish-Becker S. 41,8°C Whole body

hyperthermia as an adjunct to chemotherapy induces prolonged T cell activation in patients with various malignant diseases // Cancer. Immunol. Immunother. - 2002. - Vol. 51. - P.603-613.

11. Blazickova S., Rovensky J, Koska J, Vigas M. Effect of hyperthermic water bath on parameters of cellular Immunity // Int. J. Clin. Pharmacol. Res. - 2000. - Vol.20(1-2). - P.41-46.

12. Dieing A., Ahler O., Kerner T., Wust O., Felix R., Loffel J., Riess H., Hildebrandt B. Whole body hyperthermia induces apoptosis in subpopulation of blood lymphocytes // Immunobiology. - 2003. - 207(4). - P. 265-273.

13. Flow Cytometry: A Practical Approach / Ed. M.G.Ormerod- 2-nd Ed. – New York. 1994.

14. Hegewisch-Becker S., Nierhause A., Panse J., WiedemannG., Hossfeld D.K. Whole body hyperthermia has a stimulatory effect on the immune cell activity in cancer patients // Ann. Oncol. - 1998. - Vol.9. - P.653.

15. Hildebrandt B.,Wust T., Ahlers O., Dieing A., Sreenivisa G., Kerner T., Felix R., Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia // Crit. Rev. Oncol. Hematol. - 2002. - Vol.43. - P.33-56.

16. Hammami M.M., Bouchama A., Shail E., Aboul-Enein H.Y., Al-Sedairy S. Lymphocyte subsets and adhesion molecules expression in heat stroke and heat stress // J. Appl. Physiol. - 1998. - Vol.84. - P.1615-1621.

17. Kappel M., Poulsen T.D., Hansen M.B., Gabbo H., Pedersen B.K. Somatostatin attenuates the hyperthermia induced increase in neutrophil concentration// Europ. J. Appl. Physiol. - 1998. - Vol. 77(1-2). - P.149-156.

18. Katschinski D.M., Wiedemann G.J. Longo W., d'Oleire F.R., Spriggs D., Robins H.I. Whole body hyperthermia cytokine induction: a review, and unifying hypothesis for myeloprotection in the setting of cytotoxic therapy // Cytokine Growth Factor Rev. - 1999. - Jun; 10 (2). - P. 93-97.

19. Kearns R.J., Ringler S., Krakowka S. Talmann R., Sites J., Oglesbee M.G. The effects of extracorporal whole body hyperthermia on the functional and phenotypic features of canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) // Clin. Exp. Immunol. - 1999. - Apr; 116(1). - P.188-192.

20. Oglesbee M.J., Diehl K, Krawford E, Kearns R.J, Krakowka S. Whole body hyperthermia: effects upon canine immune and hemostatic functions // Vet Immunol Immunopathol. - 1999. -Aug 2. - Vol.69(2-4). - P.185-199.

21. Robins H.I., Grosen E., Katschinski D.M., Longo W., Tiggelaar G.L., Winawer J., Graziano F. Whole body hyperthermia induction of soluble tumor necrosis factor receptors: implications for rheumatoid diseases // J. Rheumatol. - 1999. - Dec; 26(12). - P.2513-2516.

22. Robins H.I., Kutz M., Wiedemann G.J., Katschinski D.M., Paul D., Grosen E., Tiggelaar G.L., Spriggs D., Gillis W., d'Oleire F.R. Cytokine induction by 41.8 degrees C whole body hyperthermia // Cancer Lett. - 1995. - Nov 6. - Vol.97(2). - P.195-201.

поступила в редакцию 13.07.2005
отправлена на доработку 15.09.2005
принята к печати 18.01.2006