

ІМУНОТЕРАПІЯ ХВОРИХ ОСТЕОГЕННОЮ САРКОМОЮ ГЕМОПОЕТИЧНИМИ КЛІТИНАМИ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

Радзівська Л.В.

Клініка клітинної терапії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця

Центр ембріональних тканин "EmCell"

Radzievskaya L.V. IMMUNOTHERAPY OF PATIENTS SUFFERING FROM OSTEOGENIC SARCOMA BY FETAL LIVER HEMOPOIETIC CELLS. There are many examples in the literature concerning to the ability of the transplanted fetal liver hemopoietic cells (FLHC) to restore immunity and hemopoiesis in the patients suffering from different diseases. The purpose of the present work: the correction of antitumor immunity's disorders and restoration of hemopoiesis in patients with osteogenic sarcoma. Observed were 14 childrens of the age 8 to 15 years with osteogenic sarcoma. Patients were subjected to standard cytostatic thrapy and transplantation of human FLHC suspensions. Transplantation was performed with use of 7 to 12 weeks of gestation cryopreserved FLHC. Suspensions were in-vein injected by volume 2-4 ml, amount of administered cells including nuclei was $0.1 - 4 \times 10^8$ and content of CFU-GM, $0.6 - 1.5 \times 10^6$. Estimation of transplantation efficiency was analysed according to patient state changes and influence on immunologic (total amount of lymphocytes including subsets of lymphocytes with CD3+, CD4+, CD8+ and CD19+ phenotypes; ratio of CD4+/CD8+, big granular lymphocytes (BGL) quantity in a peripheral blood) and hematologic (amount of leukocytes, erythrocytes, and number of Hb) indices. Were noted positive immunologic changes in the patients after FLHC transplantation. The total amount of lymphocytes, CD3+ and CD4+ lymphocytes was increased on 7th day, the number of BGL was incresed since 5th – 8th days. Substantial increase in amount of leukocytes was observed on the 10th day from cell therapy in patients with leukopenia. Programmed cytostatic therapy was performing during 60 days in a order planned before. Blood indices were remaining rather stable. Obtained results suggest that transplantation of human fetal liver hemopoietic cells is effective method in complex treatment of patients with osteogenic sarcoma.

Актуальною задачею сучасної онкології є вироблення методів, які підвищують ефективність елімінації пухлинних клітин, метастазуючих у віддалені органи. Провідна роль у цьому процесі

належить системі імунного нагляду, протипухлинний потенціал якої є значним.

Засновник теорії імунного нагляду Бернет припускав, а наступні дослідники затвердили положення про те, що приматом імунного нагляду є Т-

лімфоцити, які розпізнають специфічні антигени пухлини та служать ефекторними клітинами протипухлинних реакцій [4]. Подальші роботи Рубин та інших авторів довели, що функція Т-лімфоцитів не вичерпує механізмів резистентності до пухлин, тому що існують інші фактори опору організму пухлинному росту. Більш того, Т-лімфоцити мобілізуються пізніше цих факторів. Уже після робіт Prehn стало зрозуміло, що вирішальну роль у стійкості організму до пухлин відіграють натуральні кіллери (NK), котрі здійснюють лізис пухлинних клітин-мішеней без попередньої імунізації та незалежно від антитіл та комплементу [4]. Ще одним важливим компонентом природної резистентності до пухлин є активовані макрофаги.

Таким чином, виділяється декілька основних типів цитотоксичних клітин, здатних до елімінації змінених власних та чужорідних клітин.

Використання протипухлинного потенціалу цитотоксичних клітин в імунотерапії онкологічних хворих стало предметом пошуку останніх десятиріч. Результатом зусиль у цьому напрямку стала розробка методу адаптивної імунотерапії, котра ґрунтується на переносі протипухлинного імунітету за допомогою живих лімфоїдних клітин або їх субклітинних фракцій. Одним із видів адаптивної імунотерапії є клітинна імунотерапія з опосередкованою дією, до якої відноситься трансплантація стовбурових кровотворних клітин, джерелом яких може бути клітинна суспензія, виготовлена з ембріональної печінки людини [5].

Ембріональна печінка людини (ЕПЛ) з 6 по 24 тижні гестації є основним кровотворним органом. У цей період вона містить високу концентрацію стовбурових клітин, здатних до проліферації та диференціації. Гемопоетичні клітини, які надходять із ембріональної печінки (ЕП), здатні до репопуляції в лімфоїдні органи навіть у тих випадках, коли вони взяті ще до того, як у експериментальних тварин з'явиться тимічний лімфопоез [1].

ЕП ссавців служить джерелом первинної популяції В-лімфоцитів, містить попередники Т-клітин, а у більш пізні строки є місцем позатимусного диференціювання Т-клітин [1].

Крім стовбурових клітин ЕП містить також інші види клітин, серед яких-купферовські клітини, котрі характеризуються здатністю до секреції ІЛ-1, протипухлинного некротичного фактора α , ПГ Е₂ та D₂ та несуть поверхневі рецептори для Fc-фрагменту імуноглобулінової молекули і комплементу [1]. Це підтверджує, що ЕП є органом імунобіологічної системи гомеостазу.

ЕПЛ також характеризується імунологічною толерантністю внаслідок слабкої експресії антигенів HLA I-II кл., завдяки чому трансплантація клітин ЕПЛ приводить до успішного приживлення трансплантату без розвитку реакції "трансплантат проти хазяїна".

В науковій літературі існують чисельні дані про здатність гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини (ГК ЕПЛ) відновлювати імунологічну компетентність та гемопоез у хворих із важкою комбінованою імунологічною недостатністю при аплазіях кровотворення внаслідок хіміотерапії (ХТ) у хворих на гемобластози, солідні пухлини [3, 6, 7, 8].

В даній роботі трансплантація суспензій ГК ЕПЛ використовується в комплексному лікуванні хворих остеогенною саркомою, яким проводилась традиційна протипухлинна терапія цитостатичними препаратами.

Відомо, що і розвиток новоутворень, і основні методи їх лікування (променевої та хіміотерапевтичної) справляють виражену депресивну дію на імунну та кровотворну системи організму [2]. Погіршення стану імунної системи та мієлотоксичний ефект цитостатичних препаратів у багатьох випадках лімітують проведення сучасної ХТ та променевого лікування. Ефективним методом профілактики та лікування цих ускладнень є трансплантація стовбурових гемопоетичних клітин, джерелом яких може бути печінка ембріону людини. Тому трансплантація суспензій ГК ЕПЛ в даній роботі використовується не тільки як метод адаптивної імунотерапії, але і з метою запобігання та усунення порушень гемопоезу для забезпечення проведення ХТ в запланованому режимі.

Матеріали і методи

Спостерігалася група з 14 дітей, хворих на остеогенну саркому, віком від 8 до 15 років. В усіх пацієнтів діагноз був гістологічно верифікований; у 7-ми пацієнтів була III стадія процесу (T₃N₀M₀), у 6-ти – II стадія (T₂N₀M₀) та у 1-го – III стадія з метастазами в іншу кістку. Усім хворим проводили хіміотерапевтичне лікування, котре складалося з системної ХТ доксорубіцином у сумарній дозі 90 мг. на курс та внутрішньоартеріальної ХТ цисплатином у сумарній дозі від 150 – 210 мг. Перерви між курсами ХТ у середньому складали 21 день.

Трансплантацію суспензії ГК ЕПЛ проведено у 7-ми хворих після першого чи другого курсів ХТ з метою корекції імунологічних порушень та профілактики лейкопенії при наступних курсах ХТ. У решти 7-ми хворих трансплантація проводилась після 4-5 курсів ХТ для лікування лейкопенії та корекції імунологічних порушень.

Для трансплантації використовувались кріоконсервовані клітинні суспензії, кожна з яких була отримана з печінки одного ембріона терміном гестації від 7 до 12 тижнів. Безпека матеріалу була забезпечена проведенням фетальної діагностики на наявність ВІЛ-інфекції, вірусних гепатитів В та С, вірусу краснухи, токсоплазмозу та бактеріальну стерильність. Суспензії вводились внутрішньовенно крапельно у об'ємі 2–4 мл. з кількістю клітин з ядрами 0,1–4x10⁸ та вмістом КУО ГМ 0,6 – 1,5x10⁵.

Об'єкту ефективності трансплантацій досліджували за зміною стану здоров'я хворих та за впливом на імунологічні (загальна кількість лімфоцитів та їх субпопуляцій: лімфоцитів з фенотипом CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, співвідношення CD4+/CD8+) та гематологічні (число лейкоцитів, еритроцитів, кількість гемоглобіну) показники. Імунофенотип лімфоцитів визначали за допомогою моноклональних антитіл фірми "Сорбент" (Росія). NK-клітини, які є важливим фактором природної протипухлинної резистентності організму, оцінювались за кількістю великих гранулярних

лімфоцитів (ВГЛ) в периферійній крові. Дослідження імунологічних показників проводили до і на 7 та 20 добу після трансплантації, а гематологічних показників – до і на 3–60 добу після трансплантації ГК ЕПЛ.

Результати та обговорення.

Усі хворі перенесли трансплантацію гемопоетичних ембріональних суспензій задовільно, без розвитку сторонніх реакцій. На другу добу після трансплантації в 30% випадків у хворих відмічався синдром раннього післятрансплантаційного покращення у вигляді зменшення слабкості, покращення апетиту, сну, збільшення активності.

При дослідженні показників клітинного імунітету до трансплантації після проведення хіміотерапії відмічено значне їх пригнічення (табл.1). Так у порівнянні з групою практично здорових людей у хворих спостерігали достовірне зниження абсолютної кількості лімфоцитів та їх субпопуляцій: CD3+, CD4+, CD8+ лімфоцитів. Відмічалось також зменшення співвідношення CD4+/CD8+, що характерно при остеогенній саркомі.

Трансплантат справляв активуючу дію на клітинний імунітет реципієнта. Так на 7 добу після трансплантації збільшилась абсолютна кількість Т-лімфоцитів (CD3+) до $(1.05 \pm 0.39) \times 10^9 / \text{л}$ у порівнянні з $(0.28 \pm 0.01) \times 10^9 / \text{л}$ та абсолютна кількість CD4+ до $(0.54 \pm 0.16) \times 10^9 / \text{л}$ у порівнянні з $(0.16 \pm 0.01) \times 10^9 / \text{л}$; збільшення останніх було статистично вірогідним ($p < 0.05$) (табл.1). Співвідношення CD4+/CD8+ також підвищилось до (1.49 ± 0.03) у порівнянні з (1.13 ± 0.23) , хоча і не досягло нормального рівня.

Таблиця №1.

Показники клітинного імунітету після трансплантації суспензій ГК ЕПЛ в комплексному лікуванні хворих остеогенною саркомою

Імунологічні показники	Практично здорові	Термін спостереження, доба		
		До Трансплантації	Через 7 днів	Через 20 днів
	M [±] m	M [±] m	M [±] m	M [±] m
Лімфоцити, 10 ⁹ /л	1,71±0,58	0,52±0,13	1,31±0,41	1,44±0,56
Лімфоцити-CD19+, 10 ⁹ /л	0,21±0,08	0,07±0,05	0,03±0,01	0,08±0,04
Лімфоцити-CD3+, 10 ⁹ /л	1,34±0,02	0,28±0,01*	1,05±0,39	0,89±0,47
Лімфоцити-CD4+, 10 ⁹ /л	0,86±0,01	0,16±0,01*	0,54±0,16*	0,16±0,02
Лімфоцити-CD8+, 10 ⁹ /л	0,52±0,01	0,15±0,03*	0,36±0,12	0,57±0,38
CD4+/CD8+	1,63±0,04	1,13±0,23	1,49±0,03	0,43±0,33

* – різниця середніх величин в групах здорових і хворих дітей статистично вірогідна, $p < 0,05$.
 ** – різниця середніх величин до і після трансплантації статистично вірогідна, $p < 0,05$.

Виявлені зміни в параметрах клітинного імунітету носили тимчасовий характер. Так, на 20 день після трансплантації розвиток імунної реакції супроводжувався порушенням у співвідношенні CD4+/CD8+ в бік зменшення відносної і абсолютної кількості CD4+ та збільшення CD8+ до рівня практично здорових людей. Це, можливо, пов'язано із активністю CD8+, які протистоять клітинній імунній відповіді реципієнта на алогенний трансплантат.

До трансплантації після ХТ кількість ВГЛ була суттєво знижена і становила $(0,016 \pm 0,07) \times 10^9 / \text{л}$ проти $(0,270 \pm 0,020) \times 10^9 / \text{л}$ у здорових дітей ($p < 0,05$). Трансплантація ГК ЕПЛ сприяла підвищенню рівня цих клітин: уже з 5 – 8 днів рівень ВГЛ зріс в 1,5 рази

$(0,024 \pm 0,006) \times 10^9 / \text{л}$ і продовжував поступово наростати у подальші терміни спостереження. Через місяць після трансплантації реєструвалось 3-разове зростання рівня ВГЛ порівняно з вихідними показниками ($p < 0,05$), але ще не досягало норми.

При аналізі гематологічних показників отримані наступні результати. Середнє значення загального числа лейкоцитів на момент трансплантації становило $(3,09 \pm 0,38) \times 10^9 / \text{л}$. Статистично вірогідне підвищення числа лейкоцитів відмічалось з 10-ї доби після трансплантації $(4,9 \pm 0,83) \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$). У проміжку з 25 по 35 добу відмічалось незначне зниження числа лейкоцитів $(3,6 \pm 0,52) \times 10^9 / \text{л}$ (як правило, у цей період хворим проводився черговий курс ХТ), та уже з 40 по 60 добу показник числа лейкоцитів знову нормалізувався $(4,7 \pm 0,54) \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$). Хіміотерапевтичне лікування на протязі цих 60 днів проводилось своєчасно та в повній дозі.

Кількість НЬ та еритроцитів до та після трансплантації залишалась стабільною і не потребувала додаткової корекції.

При аналізі віддалених результатів отримані наступні дані: дворічне безрецидивне виживання в даній групі хворих на остеогенну саркому склало 41,6%. За час спостереження за хворими (до 3-х років) не відмічено негативного впливу ГК ЕПЛ на перебіг пухлинного процесу.

Висновки.

Суспензії ГК ЕПЛ, введені хворим на остеогенну саркому під час проведення ХТ, спричинюють:

- позитивні імунологічні зміни у вигляді підвищення абсолютної кількості лімфоцитів, CD3+ , CD4+ -лімфоцитів та співвідношення CD4+/CD8+ на 7 добу; підвищення кількості ВГЛ з 5-8 днів; тенденція до росту кількості ВГЛ зберігалась в подальші терміни спостереження (1 місяць);
- покращення гематологічних показників: у хворих з лейкопенією вірогідно підвищувалась кількість лейкоцитів з 10-ї доби;
- поліпшення загального стану хворих, що розцінюється як більш високий рівень якості життя даної категорії хворих.

Усе це свідчить про доцільність використання трансплантації ГК ЕПЛ як методу імунотерапії та для профілактики і лікування цитостатичної цитопенії у хворих на остеогенну саркому.

Література

- 1 Арцимович Н.Г., Настоящая Н.Н., Казанский Д.Б. и др. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза. //Успехи современной биологии. -1992.-Т.112,вып.1,-С.88-93.
- 2 Бендюг Г.Д., Гриневич Ю.Я., Смиколуб О.І., Храновська Н.М., Глуховська І.Ю., Іванкова В.С., Радзівєвська Л.В., Снігірь Н.В. Вплив трансплантації клітин ембріональної печінки на деякі показники, що характеризують стан імунної системи онкологічних хворих в динаміці протипухлинного лікування. //Міжвідомчий збірник "Гематологія і переливання крові", Вип.29 - Київ "Нора-прінт" 1998.-С.214-220.
- 3 Радзівєвська Л.В., Смиколуб О.І., Снігірь Н.В., Бендюг Г.Д., Глуховська І.Ю., Іванкова В.С., Храновська Н.М. Імунотерапія злоякісних пухлин гемопоетичними клітинами ембріональної печінки людини. //Матеріали науково-практичної конференції

"ТЕОРЕТИЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА"

- "Імуноterapia при лікуванні злоякісних новоутворень.", *СМА*, 1998, стор. 104-110.
4. Славина Е.Г. Лимфоциты естественные киллеры (NK-клетки)-эффекторные клетки естественной противоопухолевой резистентности. //Итоги науки и техники.- ВИНТИ. Онкология.-1984.-Т.13.-с.98-141.
 5. Смикодуб О.І. Клітинна терапія - сучасний напрямок імунотерапії в онкологічній практиці. //Матеріали науково-практичної конференції "Імуноterapia при лікуванні злоякісних новоутворень.", Київ, 1998, стор. 115-121.
 6. Smikodub A.I., Snigir N.V., Radzievskaya L.V., Grinevich Y.A., Bendug G.D. Experience in treatment of patients suffering from leukosis and solid tumors by fetal stem cells// Abstracts of the 10th International Symposium Supportive Care in Cancer, San Antonio . Supportive Care in Cancer, 1998, V. 6.- No. 2.- P.166-10.
 7. Smikodub A.I, Radzievskaya L.V., Snigir N.V. Treatment of cytostatic agranulocytosis by means of transplantation of fetal liver hemopoietic cells.// Cell transplantation, 1999, V.8 -No.2 -P.200.
 8. UNITED STATE PATENT. Number: 5,811,089. Date of patent: Sep. 22, 1998. PHARMACEUTICAL PREPARATION BASED ON FETAL SUSPENSION AND METHODS OF TREATING ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME (HIV INJECTION). Inventors: Smikodub A.I., Markov I.S., Pilipchak E.M