

На правах рукописи



ШИШКОВ АЛЕКСЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

**Клинико-иммунологическое исследование эффективности
вакцинотерапии при злокачественных новообразованиях
толстой кишки**

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Селедцова Галина Викторовна

Официальные оппоненты:

Колесникова Ольга Петровна доктор медицинских наук, заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии отдела экспериментальной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

Кологривова Елена Николаевна доктор медицинских наук, профессор кафедры иммунологии и аллергологии медико-биологического факультета Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

Защита состоится «14» марта 2013 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН

Автореферат разослан «11» февраля 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Белгородцев С.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Онкологические заболевания на протяжении многих лет занимают одно из лидирующих мест по заболеваемости и смертности человека. В экономически развитых странах смертность от злокачественных заболеваний достигает в год от 25 до 29% от всех случаев гибели людей, вызванных какими либо болезнями. Из года в год данные показатели хоть и незначительно, но неуклонно растут. [Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2010; GLOBOCAN, 2008]. По данным различных медицинских центров, общая 5-летняя выживаемость в группе больных колоректальным раком (КРР) после радикальной операции варьирует от 30 до 60% [Трапезников Н.Н., 2001; J. Randolph N. et al.,2008]. У 40–60% оперированных больных наступает дальнейшая диссеминация процесса в различные сроки после операции, при IV стадии заболевания показатели 5-летней выживаемости больных не превышают уровня 5%. Что касается других видов лечения (лучевая терапия и химиотерапия), то их эффективность при диссеминированной форме колоректального рака остается крайне низкой [Mitsuru I. et al., 2012; Таразов П.Г и соавт., 2007].

В настоящее время активная специфическая иммунотерапия является быстро развивающимся и одним из наиболее перспективных направлений в лечении и профилактике онкологических заболеваний. Существуют и продолжают разрабатываться многочисленные подходы к созданию противоопухолевых вакцин [Barve M. et al., 2008; Berzofsky J.A.et al.,2004;], которые проходят клинические испытания в медицинских центрах многих стран. Однако, эффективность их использования пока далека от желаемой [Eva L. et al. 2012; Gridelli C. et al., 2009; Schmollinger J.C.,2003].

В экспериментальных работах было показано, что использование чужеродных (ксеногенных) опухолевых клеток значительно повышает иммуногенность вакцины и обеспечивает формирование у вакцинируемых животных специфического как клеточного, так и гуморального ответа к опухолеассоциированным антигенам (ОАА) собственных опухолей [Wei Y.Q.et al.,2000; Graf N.et al.,2003, Burgdorf S, 2006]. Ранее в ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН была разработана технология вакцинации на основе мышинных опухолевых клеток, пилотные клинические испытания которой у пациентов с меланомой кожи продемонстрировали безопасность и эффективность данного метода терапии [Seledtsov V.I., 2006]. Полученные обнадеживающие результаты (увеличение продолжительности жизни пациентов с диссеминированной формой меланомы кожи и отсутствие выраженных побочных явлений) явились поводом для проведения клинических испытаний разработанной вакцинотерапии у больных с другой локализацией злокачественных образований, в частности у пациентов с диссеминированной формой колоректального рака, а так же исследования механизмов формирования специфического противоопухолевого иммунного ответа.

Цель работы – исследование эффективности ксеновакцинотерапии пациентов с диссеминированной формой злокачественных новообразований толстой кишки и механизмов индукции специфического противоопухолевого иммунитета.

Задачи исследования:

1. Оценить безопасность, клиническую эффективность и влияние ксеновакцинотерапии на динамику общеклинических, биохимических показателей и параметров иммунного статуса у пациентов с диссеминированной формой колоректального рака.

2. Исследовать показатели специфических Т- и В-клеточных противоопухолевых реакций в группах пациентов ответивших и не ответивших на ксеновакцинотерапию и выявить параметры иммунитета, значимо различающиеся у пациентов данных групп.

3. Определить влияние ксеновакцинотерапии на продукцию цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-1,4,6,8,10, ИФН- α , ФНО- α) мононуклеарными клетками крови у больных диссеминированной формой колоректального рака в группах пациентов с наличием и отсутствием клинического ответа на иммунотерапию.

4. Оценить влияние вакцинации на численность Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+FoxP3+) и количественный состав (CD4+CD45RO+) и (CD8+CD45RO+) клеток памяти в группах пациентов ответивших и не ответивших на ксеновакцинотерапию.

Научная новизна работы. Впервые показано, что иммунотерапия пациентов с IV стадией КРР на основе полиантигенной ксеногенной клеточной вакцины способна индуцировать клеточный противоопухолевый иммунитет на аллогенные опухолевые клетки. Впервые охарактеризованы механизмы, определяющие противоопухолевое действие вакцины. Среди них – увеличение цитокин продуцирующей активности мононуклеаров крови (ИФН- γ , ИФН- α , ИЛ-8), стимуляция реакций преимущественно клеточного иммунитета, характеризующихся ростом реакции ГЗТ, увеличением количества CD4+-клеток памяти и уменьшением содержания в кровотоке Т-регуляторных клеток.

Научная и практическая значимость работы. Результаты проведенной работы позволяют сделать вывод о возможности стимуляции противоопухолевых реакций у пациентов с диссеминированной формой колоректального рака с помощью входящих в состав вакцины ксеногенных ОАА. Выявленная способность вакцины эффективно стимулировать специфический клеточный иммунитет и пролонгировать жизнь пациентов с колоректальным раком может стать основой в разработке принципиально новых подходов к иммунопрофилактике и комплексному лечению онкологических заболеваний. Реакция ГЗТ *in vivo* на различные АГ в процессе лечения является простым и интегративным тестом оценки динамики противоопухолевых реакций организма в ответ на иммуностимуляцию (вакцинацию). На основе проведенных клинических исследований разработаны патенты на ксеногенную вакцину и способ вакцинотерапии злокачественных новообразований (патенты РФ №№ 2192883, 2192884)

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ксеновакцинотерапия является новым безопасным и эффективным иммунотерапевтическим методом лечения способным увеличить продолжительность жизни больных с диссеминированной формой КРР.

2. Клинический ответ на вакцинотерапию ассоциируется с изменениями Т-клеточного звена иммунитета, характеризующегося ростом уровня реакции ГЗТ, продукции ИФН- γ , ИФН- α , ИЛ-8, увеличением количества Т-клеток памяти и снижением количества Т-регуляторных клеток в процессе лечения.

Апробация результатов. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 7-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН (Новосибирск, 2006г), Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Красноярск, 2010), 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН (Новосибирск, 2011г).

Объем и структура диссертации. Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 117 страницах машинописного текста, включающего 13 таблиц и 5 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 160 литературных источников, в том числе 149 зарубежных.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов работ соискателей учёной степени кандидата наук.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.м.н, Г.В. Селедцовой за поддержку и помощь, оказанную при работе над диссертацией, сотрудникам «лаборатории клеточных биотехнологий» и «лаборатории клинической иммунопатологии» (руководитель лаборатории д.м.н., профессор В.С. Кожевников) НИИКИ СО РАМН за практическую помощь в проведении экспериментальной части исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика основной и контрольной групп пациентов. В исследование включены больные, проходившие лечение диссеминированной формы колоректального рака в Клинике иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН в период с 2007 по 2012 годы. Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 №2288), было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН №67 от 20 января 2012г.

Критериями отбора пациентов являлись: отсутствие выраженных нарушений со стороны функций внутренних органов и признаков поражения центральной нервной системы, а также тяжелой инфекционной патологии. Исходный уровень функциональной активности по Карновскому не менее 70%. Все пациенты, включенные в исследование, имели нормальные гематологические и биохимические показатели (отсутствие признаков анемии и нарушения функций внутренних органов). Пациенты не получали химиотерапевтического или гормонального лечения в течение 2 месяцев до момента начала, а также в течение всего периода проведения вакцинотерапии. Параметры иммунитета пациентов с колоректальным раком были оценены до начала и после проведения индуцирующего курса вакцинотерапии.

Группу контроля составили пациенты, получавшие паллиативную и симптоматическую терапию и сопоставимые с больными основной группы по полу, возрасту, локализации и распространенности опухолевого процесса, а так же показателям уровня качества жизни.

Характеристика больных основной и контрольной группы приведена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика основной и контрольной групп пациентов

Характеристика	Основная группа	Контрольная группа
Количество пациентов	60	60
Пол:		
мужчины	33(53%)	33 (53%)
женщины	27 (47%)	27 (47%)
Средний возраст, годы	61,1 ± 1,4 (от 38 до 79)	55,6 ± 1,7 (от 30 до 80)
Локализация метастазов:		
легкие	13 (22%)	9 (15%)
печень	44 (73%)	30 (51%)
лимфатические узлы, мягкие ткани	27 (46%)	28 (47%)
другие локализации (мозг, кости и др.)	18 (30%)	13 (22%)
Общий статус (шкала Крановского)		
100-90%	26(42%)	23(37)
80-70%	34(58%)	37(63%)
Предшествующее лечение		
хирургическое	19(32%)	17(28%)
хирургическое, химиотерапия	9(15%)	8(13%)
хирургическое, химиотерапия, лучевая терапия	1(2%)	1(2%)
лучевая терапия	1(2%)	1(2%)
без лечения	4(7%)	5(8%)

Верификация диагноза осуществлялась на базе МУЗ ГКБ №1 и ГБУЗ НСО «НООД» г.Новосибирска стандартными методами используемыми в онкологической практике (МСКТ, МРТ, УЗИ, биопсия и гистологический анализ материала и т.д.). Распространенность процесса согласно классификации TNM (Union Against Cancer (UICC) and American Joint Committee on Cancer (AJCC) stagingsystem 2009) и морфологический вариант опухоли (J.J.Jass et. L.H.Sobin WHO, 1989) указаны в таблице №2.

Таблица 2. Морфологическое строение и распространенность опухолевого процесса (UICC and AJCC)

Морфологическая форма рака толстой кишки	Распространенность процесса (TNM)	Основная группа (n=60)	Контрольная группа (n=60)
аденокарцинома	IIIa (T ₁ N ₁ M ₀ -T ₂ N ₁ M ₀) IIIb (T ₃ N ₁ M ₀ -T ₄ N ₁ M ₀) IIIc (T _{любая} N ₂ M ₀) IV(T _{любая} N _{любая} M ₁)	1(2%) 6(10%) 19(32%) 23(38%)	2(3%) 8(13%) 16(26%) 24(40%)
слизистая аденокарцинома	IIIa (T ₁ N ₁ M ₀ -T ₂ N ₁ M ₀) IIIb (T ₃ N ₁ M ₀ -T ₄ N ₁ M ₀) IIIc (T _{любая} N ₂ M ₀) IV(T _{любая} N _{любая} M ₁)	- 2(3%) 1(2%) 2(3%)	1(2%) 2(3%) 4(7%) 1(2%)
перстневидно-клеточный рак	IIIc (T _{любая} N ₂ M ₀) IV(T _{любая} N _{любая} M ₁)	3(5%) 2(3%)	2(3%) -
Недифференцированный рак	IIIc (T _{любая} N ₂ M ₀)	1(2%)	-

Определение эффективности безопасности вакцинотерапии

Определение эффективности лечения проводили в соответствии с критериями ВОЗ и стандартными методами обследования, используемыми в

онкологической практике. Исходная оценка опухолевых очагов выполнялась не позднее, чем за 1 месяц до начала иммунотерапии. Эффект терапии оценивали после завершения индуцирующего курса иммунотерапии (через 3 месяца с момента начала терапии), далее (у пациентов с полным и частичным регрессом опухолевых очагов или стабилизацией) каждые 3 месяца до прогрессирования заболевания. Выделяли следующие варианты течения заболевания: полная регрессия, частичная регрессия, стабилизация и прогрессия заболевания. Под полной регрессией (ПР) понимали полное исчезновение всех опухолевых очагов при двух последовательных исследованиях (КТ, МРТ, УЗИ). К частичной регрессии (ЧР) относили случаи уменьшения маркерных опухолевых очагов не менее чем на 30% от суммы всех наибольших диаметров очагов, принимая за точку отсчета исходное измерение. Прогрессирование заболевания (ПРЗ) констатировали при увеличении маркерных очагов не менее чем на 20% от суммы всех наибольших диаметров либо появлении новых очагов. Стабилизацию заболевания регистрировали при недостаточном уменьшении опухолевых очагов, чтобы соответствовать критериям ЧР, и недостаточном их увеличении, чтобы соответствовать критериям прогрессирования. Продолжительность регрессии измеряли со времени первой документированной даты ПР или ЧР и до первой даты, когда было объективно зарегистрировано ПРЗ или рецидив. Время до прогрессирования рассчитывали как период от начала терапии и до того момента, когда выявляются критерии ПРЗ. Для оценки продолжительности жизни больных наблюдение за ними, включая пациентов, выбывших из исследования в связи с ПРЗ, и пациентов, у которых ПРЗ развилось после завершения исследования, выполняли каждые 3 месяца на протяжении как минимум 3 лет. На основании данных критериев впоследствии основная группа была разделена на подгруппы в зависимости от эффекта от терапии.

Мониторинг безопасности лечения осуществляли на основании учета частоты и степени выраженности побочных эффектов. Кроме того критериями безопасности вакцинотерапии служили измерение жизненно важных показателей, оценка результатов исследования гематологических и биохимических показателей, данные иммунного статуса и т.д. Все клинически значимые отклонения от нормы лабораторных показателей наблюдали до момента их разрешения либо возвращения к исходному уровню.

Приготовление вакцины. Опухолевые линии В16 и LLC выращивали и перевивали мышам линии С57В16 (В6, Н-2b). Содержание, уход и выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Strasbourg, 1986). По достижению опухолевых узлов необходимой величины, животных умерщвляли и в стерильных условиях забирали опухолевую ткань. Собственно вакцина готовилась смешиванием двух клеточных лизатов: 70% клеточного лизата линии В16 и 30% линии LLC. В последующем антигенный материал фиксировали, высушивали с помощью лиофильной сушки VirTis Benchtop ES (VirTis corp.,inc., USA) и расфасовывали во флаконы в необходимых массовых эквивалентах, стерилизовали и хранили в темном прохладном месте при температуре -5 °С. Перед введением вакцину разводили в 2,0 мл физиологического раствора и вводили внутрикожно/подкожно в межлопаточную область.

Схема вакцинации. Вакциноterapia включала в себя индуцирующий и поддерживающий курсы. Индуцирующий курс представлял собой 8 подкожных иммунизаций: 4 вакцинации с недельным и 4 с двухнедельным интервалом, по 75×10^6 лиофилизированных клеток на дозу. Поддерживающий курс 6 вакцинаций с интервалом в один месяц, далее 1 раз в 3 месяца в течение всего срока наблюдения.

Оценка пролиферативной активности мононуклеарных клеток крови. Из гепаринизированной крови стандартным методом выделяли мононуклеарные клетки (МНК). Лимфоциты культивировали в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для стимуляции лимфоцитов использовали клеточные лизаты ксеногенных опухолевых линий (В16-меланома, LLC-карцинома), опухолевых линий человека (Сасо-2 -аденокарцинома сигмовидной кишки, Colo 320 HSR – аденокарцинома толстой кишки и Bro- меланома). В качестве контроля к ксеногенным антигенам использовали клеточный лизат селезенки мыши, а к аллогенным антигенам - пулированный клеточный лизат мононуклеаров крови доноров. Интенсивность пролиферации оценивали через 120 ч по включению H^3 -тимидина. Подсчет радиоактивности материала производили в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL – 30 (Intertechnic, Франция). Результаты представлены в виде индекса стимуляции (ИС), т.е. отношения уровня ответа в антиген-стимулированных культурах к уровню ответа в контроле. $\text{ИС} = \text{опыт (имп/мин)} / \text{контроль (имп/мин)}$.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*. В качестве антигенов в реакции ГЗТ *in vivo* использовали белковые лизаты опухолевых клеток вакцины. Контролем на ксеногенные белки вакцины служила реакция на белковый лизат селезенки мыши. Реактивность на каждый лизатный препарат оценивали отдельно. Учет реакции производили через 12, 24, 36, 48 часов по максимальному диаметру области гиперемии в месте введения антигена. У большинства пациентов пик реакции приходился на 24 часа, поэтому в дальнейшем учитывали реакцию только через 24 часа. Реакция меньше 10 мм в диаметре считалась отрицательной.

Определение субпопуляционного состава клеток иммунной системы. Приготовление образцов для определения относительного содержания субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные CD-маркеры, проводили в соответствии со стандартной методикой. Подготовленные таким образом пробы подвергали исследованию в проточном цитофлюориметре FACSCalibur фирмы („Becton Dickinson”, USA) с помощью программы CellQuest (Becton Dickinson”, USA) с использованием соответствующих FITC-меченых моноклональных антител («Сорбент» и «МедБиоСпектр», Москва, Россия), с определением относительного содержания лимфоцитов, экспрессирующих соответствующий CD-маркер, среди 10000 просчитанных клеток. Использовали моноклональные антитела к следующим поверхностным молекулам: CD4, CD8, CD25, CD45RO, FoxP3, CD62L.

Определение уровня антител к антигенам аллогенных опухолевых линий методом Вестернблот анализа. Белковые антигены (опухолевый лизат) переносили на мембрану (нитроцеллюлозу), где они метились с использованием антител, специфичных к целевому белку. В качестве источника антигена использовали белковые лизаты, полученные из клеточных опухолевых линий мыши (В16, LLC) и клеточных опухолевых линий человека (BRO, Сасо-2, Colo 320Hsr). Антигенные белки разделяли электрофоретически в 10% ПААГ-ДСН и

затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Towbin H., et al., 1979), которую после блокирования сайтов неспецифического связывания раствором 3% БСА инкубировали с соответствующими рекомбинантными антителами. Связавшиеся фаговые антитела проявляли поликлональными анти-M13 антителами сыворотки кролика (в разведении 1:16000. Визуализацию иммунных комплексов проводили, добавляя 5-бromo-3-индолил фосфат и нитро-тетразолиевый голубой.

Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови проводили стандартным ИФА-методом с стандартно с помощью иммуноферментных тест-систем (производство ЗАО “Вектор-Бест”, Кольцово, Россия). Использовали моноклональные антитела к ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИНФ- α , ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10. Фотометрию проводили на ELISA-процессоре фирмы „Labsystems Multiskan MS” при длине волны 450 нм.

Определение уровней аутоантител и ревматоидного фактора. Определение проводили стандартно с помощью стандартных иммуноферментных тест-систем (производство «ООО Хема-Медика», Москва). в соответствии с инструкцией фирмы-производителя Фотометрию проводили на ELISA-процессоре фирмы „Labsystems Multiskan MS” при длине волны 492 нм.

Клинико-лабораторные исследования и методы. Клинико-лабораторное обследование проводилось по стандартным схемам с оценкой общепринятых лабораторных показателей сотрудниками клинико-биохимической лаборатории Клиники иммунопатологии ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН г.Новосибирска под руководством Меняевой Е.В. IgA, IgM, IgG в сыворотках крови определяли нефелометрическим методом с использованием наборов фирмы „Имбио”, Нижний-Новгород.

Статистическая обработка полученных результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили методами описательной, непараметрической статистики (критерии Уилкоксона и Манна-Уитни); выживаемость пациентов оценивали критерием Kaplan & Meier, логрангового критерия и методом регрессионной модели Кокса с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (SAS v9.3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние вакцинотерапии на качество жизни. На протяжении всего срока наблюдения (36 месяцев) нами не было зарегистрировано ни одного случая серьезной нежелательной реакции, связанной с ксеновакцинацией, у пациентов принимающих специфическую иммунотерапию. Из ожидаемых нежелательных явлений у 27% (10 человек), в первые сутки после вакцинации, отмечалось повышение температуры тела до 37,0 $^{\circ}$ C – 37,5 $^{\circ}$ C. Кроме того, у 73% (27 чел.) отмечалась локальная реакция в виде гиперемии и отека в месте введения препарата. Как правило, данные явления купировались самостоятельно, в редких случаях больные использовали нестероидные противовоспалительные средства. Выше перечисленные явления не оказывали существенного влияния на качество жизни пациентов, о чем так же свидетельствуют данные оценки влияния терапии на показатели индекса качества жизни пациентов по Карновскому (таб. 3).

Таблица 3. Оценка влияния вакцинотерапии на показатели индекса качества жизни (шкала Карновского) пациентов с КРР ($M \pm m$)

	Индекс качества жизни		
	до лечения	через 3 месяца	через 6 месяцев
Пациенты с клиническим эффектом (n=21)	86,43± 6,15	86,67± 5,77	86,43± 4,78
Пациенты без клинического эффекта (n=16)	79,38± 3,59	77,81± 4,07	75,56± 5,83*

Примечание* $p=0,023$ - в сравнении с показателями на момент начала лечения (парный критерий Стьюдента)

Биохимические и иммунологические параметры системы крови у пациентов в процессе лечения. Не позднее, чем за 10 дней до начала лечения и далее после проведения индуцирующего курса лечения (через 3 месяца), состояние здоровья пациентов оценивалось инструментальными и лабораторными методами исследования. Все пациенты, участвующие в исследовании, несмотря на наличие в организме распространенного опухолевого процесса, не имели значимых отклонений показателей от нормы в общем анализе за исключением показателя скорости оседания эритроцитов ($26 \pm 2,8$ мм/час), что, вероятно, обусловлено общим воспалительным процессом на фоне персистенции опухоли. На фоне лечения (через 3 месяца) данный показатель оставался на повышенном уровне ($31 \pm 4,1$ мм/час) и статистически не отличался от значений до лечения (таблица 4).

Таблица 4. Общий анализ крови ($M \pm m$) у пациентов с КРР

Показатели	норма	до лечения (n=24)		на фоне лечения через 3 месяца (n=24)	
		M	m	M	m
Гемоглобин, г/л	120-160	121	3,7	118	4,4
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,5-5,5	4,0	0,12	4,1	0,1
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	180-320	223	32,6	227	28,4
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	4-8	7	0,6	5	0,5
Палочкоядерные, %	1-6	4	0,7	1,1	0,3
Базофилы, %	0-1	1,0	0,42	1,0	0,31
Эозинофилы, %	0-5	3,0	0,60	2,0	0,49
Сегментоядерные, %	47-72	57	2,0	59	1,8
Лимфоциты, $\times 10^9/л$	19-37	30	1,9	28	2,0
Моноциты, %	3-11	6,0	0,8	5,0	0,6
СОЭ, мм/час	1-15	26	2,8	31	4,1

В биохимическом анализе крови до лечения зафиксировано повышение показателей уровня щелочной фосфатазы ($310 \pm 94,1$ ед/л), что вероятно свидетельствует о воспалительном процессе в кишечнике, так как содержание этого фермента высоко не только в костной ткани, печени, почках, но и в слизистой кишечника. На фоне лечения данный показатель существенно не изменялся, хотя и имел тенденцию к снижению ($250 \pm 116,2$ ед/л). Повышенные показатели С-реактивного белка ($51 \pm 17,3$ ед) говорят о воспалительном процессе, а незначительное повышение показателя на фоне лечения ($70 \pm 14,7$ ед.) косвенно свидетельствует о возможной активации специфического воспалительного процесса (таблица 5).

Таблица 5 Биохимический анализ крови ($M \pm m$) у пациентов с КРР

показатели	норма	до лечения (n=23)		на фоне лечения (n=23)	
		M	m	M	m
белок, г/л	65-85	71	2	73	1,1
билирубин, мкмоль/л	3,5-20,5	10,6	0,7	11,3	0,85
АЛТ, ммоль/л	0-0,68	0,48	0,114	0,36	0,063
АСТ, ммоль/л	0-0,68	0,31	0,052	0,31	0,038
Тимоловая проба, ед	0-4	2	0,49	4	0,47
ЛДГ, ед	225-450	426	57,63	483	133,36
ЩФ, ед/л	до 117	310	94,1	250	116,2
мочевина, ммоль/л	2,5-8,3	6,3	0,51	5,9	0,43
креатинин, мкмоль/л	44-100	81	11,8	85	7,3
СРБ, ед	отр	51	17,3	70	14,7
фибриноген, г/л	2-4	5	0,5	5	0,5
ПТИ	95-105%	92	1,5	93	2,2

Неспецифический противоопухолевый иммунитет, реализуемый за счет многих типов клеток (NK- клеток, моноцитов циркулирующей крови и тканевых макрофагов и др.), играет не менее важную роль в поддержании противоопухолевой защиты [Dhanji S., Ten H.S., 2003 и т.д.]. Поэтому, представляло интерес оценить исходное состояние иммунологических параметров у пациентов с КРР, а также влияние ксеновакцинации на них. (таблица 6).

Таблица 6. Показатели иммунологического статуса ($M \pm m$) пациентов с КРР

показатель	норма	с эффектом				без эффекта			
		до лечения		после лечения		до лечения		после лечения	
		(n=16)	(n=15)	(n=10)	(n=11)	M	m	M	m
лимфоцитоз	(1120-3210/мм ³)	1466	193,7	1369	527,8	2177	654,4	1509	164,0
CD3	(58-83%)	61	2,2	64	6,0	60	2,5	58	4,1
CD4	(29-59%)	34	1,8	32	4,6	33	1,1	35	3,2
CD8	(17-40%)	29	2,2	33	1,5	27	2,5	24	4,4
ИРИ	(0,9-2,8)	1,3	0,1	1,0	0,17	1	0,1	1,7	0,38
CD20	(8-17%)	8	0,7	12	0	11	1,0	8	2,5
CD16	(6-24%)	23	3,0	23	1,9	19	4,3	23	5,2
ЕА-гран	(59-89)	67	2,4	55	2,0	64	2,7	70	8,7
ЕА-мон	(52-73)	60	1,5	53	4,0	45	5,2	54	6,4
ИМ	min 0,8	0,9	0,12	0,9	0,02	0,98	0,318	1,1	0,17
ИИМ	max 0,5	0,3	0,06	0,4	0,23	0,5	0,41	0,2	0,07
ПЭФ	min 2,1	4	0,9	3,7	2,15	6,7	4,10	4,5	1,55
HLA-DR-экспрессия	(76-96%)	90	1,2	92	2,5	92	1,0	91	1,5
HLA-DR-уровень экспрессии	(0,37-0,68)	0,5	0,03	0,5	0,08	0,5	0,05	0,5	0,09
Ig M	(0,6-2,63)	2	0,3	1	0,1	2	0,2	3	0,9
Ig A	(0,68--3,78)	2	0,2	2	0,2	3	0,5	4	0,4
Ig G	(6,94-16,18)	12	0,9	12	0,4	13	1,5	13	0,7
ЦИК	(3-23 у.е.)	22	2,4	17	1,5	29	7,4	18	6,5
ПАМ	1,8-7,1	2	0,3	1,8	0,00	1,9	0,23	2,8	0,34
ПАН	2,0-9,0	4	0,6	4	0,00	3	0,8	7	1,1
К	(1-1,9)	1,7	0,11	1,8	0,35	1,4	0,11	2,0	0,33

При оценке исходного состояния иммунного статуса у пациентов с КРР, мы не выявили каких - либо отклонений от показателей нормы. Выраженных изменений показателей иммунного статуса не было выявлено у пациентов и после проведения курса ксеновакцинотерапии. Возможно, это связано с тем, что на фоне развития опухолевого процесса страдает в первую очередь функциональная активность клеток иммунной системы, а не количественное содержание клеточных популяций. Кроме того, иммунореактивность больного зависит от множества факторов, таких как: пол, возраст, объем ранее проводившегося лечения и т.д.

Влияние ксеновакцинотерапии на индукцию аутоиммунных процессов. Учитывая, что целью ксеновакцинотерапии является индукция в организме больного иммунологических реакций, направленных на распознавание опухолевых клеток как «чужеродных» и инициирование процессов отторжения, уничтожения последних, а так же, поскольку опухолевые клетки на своей поверхности несут не только опухолеассоциированные, но и тканеспецифичные антигены, не исключается вероятность стимулирования и патологических аутоиммунных реакций, [SrinivasanR., Wolchok J.D.,2004]. В связи с чем, нами были оценены показатели аутоиммунной реактивности у пациентов до и после индуцирующего курса иммунотерапии. В качестве теста на аутореактивность, нами был измерен уровень АТ к клеткам (тиреоциты), компонентам клеток (ДНК, микросомальная фракция тироцитов), белкам и липидам (ревматоидный фактор, кардиолипин) которые первыми появляются в кровотоке при аутоагрессии (таблица 7).

Таблица 7. Уровень аутоантител и ревматоидного фактора (M ± m) у пациентов с колоректальным раком до начала и после индуцирующего курса ксеновакцинотерапии

Показатели		группа с клин.эффектом(n=17)				группа без клин.эффекта(n=11)			
		до лечения		после лечения		до лечения		после лечения	
/условные ед.	норма	M	m	M	m	M	m	M	m
а/т к ДНК, у.е.	<20	21	4,1	24	6,1	22	5	20	5
а/т к ТГ, у.е.	<300	233	18,9	230	20,2	222	17	223	48
а/т к кардиолипину	<400	394	28,4	371	30,0	374	46	427	92
а/т микр.фрак.тиор.	<300	243	18,6	242	21,5	215	23	271	17
сум. РФ, у.е.	<1:100	<1:100	<1:100	<1:100	<1:100	<1:100	<1:100	<1:100	<1:100

Показано, что как до, так и в процессе лечения (через 3 месяца), данные показатели не отличались от показателей нормы.

Учитывая приведенные данные можно заключить, что ксеновакцинотерапия не сопровождалась выраженными побочными эффектами. А результаты клинко-лабораторных исследований после проведения индуцирующего курса ксеновакцинотерапии свидетельствуют об отсутствии влияния иммунотерапии на функционирование внутренних органов и активность аутоиммунных процессов.

Оценка клинической эффективности ксеновакцинотерапии у пациентов с колоректальным раком. Для оценки клинической эффективности лечения был проведен анализ трехлетней выживаемости и оценка медианы продолжительности

жизни пациентов основной и контрольной групп исследования. Так же, в соответствии с критериями ВОЗ, оценена клиническая эффективность лечения в соответствующих группах пациентов. Лечебный эффект разной степени выраженности (регрессия процесса, частичный ответ, стабилизация процесса) продолжительностью не менее 6 месяцев был достигнут у 25 (42%) пациентов получавших терапию. Из них полный ответ (полная регрессия заболевания подтвержденная инструментальными методами) отмечен у 3 (5%), частичный ответ (уменьшение опухолевых образований менее чем на 30% и остановка процесса метастазирования) - 8(13%), стабилизация процесса (остановка процесса метастазирования и увеличение объема очагов не более чем на 20%) – 14(23%). Отсутствие эффекта и как следствие дальнейшая прогрессия заболевания, зафиксировано у 35(58%) из 60 пациентов. (таблица 8).

Таблица 8. Оценка эффективности ксеновакцинотерапии у пациентов с диссеминированной формой колоректального рака

Лечебный эффект (n=60)	Кол-во наблюдений (n)	Доля от общего кол-ва наблюдений, (%)
Полная регрессия (ПР)	3	5%
Частичная регрессия (ЧР)	8	13%
Стабилизация процесса (СТ)	14	23%
Объективный ответ (ПР+ЧР)	11	18%
Лечебный эффект (ПР+ЧР+СТ)	25	42%
Прогрессия заболевания	35	58%

При анализе трехлетней выживаемости в основной и контрольной группах пациентов (рисунок 1) отмечены достоверные различия медианы продолжительности жизни, 20 месяцев в группе вакцинированных пациентов и 7 месяцев в контрольной группе (* $p < 0.0001$ - логранговый критерий, SAS v9.3) (таблица 9)

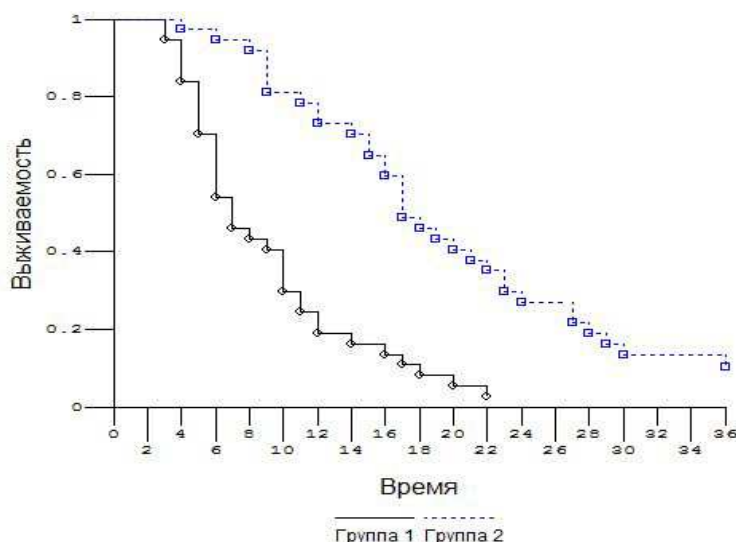


Рис.1. Анализ трехлетней выживаемость в основной (n=60) и контрольных (n=59) группах от момента генерализации заболевания.
Примечание:
Группа 1 – контрольная группа пациентов
Группа 2 – основная группа

Кроме того, отношение рисков составило $HR = 3.2$ (2.1; 5.0), $p < 0.0001$, что указывает на достоверные различия между основной и контрольной группами. (таблица 9).

Таблица 9. Анализ медианы продолжительности жизни пациентов в группах сравнения.

Параметры	Контрольная группа (n=59)	Основная группа (n=60)	Статистика
Среднее (стандартная ошибка среднего)	9,3 (1,04)	21.2 (1.36)	
Медиана продолжительности жизни [95% ДИ]	7 [5;10]	20[17;24]	
*p			<0.0001
Отношение рисков [95% ДИ]	3.2[2.1;5.0]		
**p			<0.0001

Примечание: * - Достоверность различий рассчитана с помощью Лог-рангового критерия.,

** - Достоверность различий рассчитана с помощью регрессионной модели Кокса.

Характеристика Т- и В- клеточных реакций лимфоцитов у пациентов в процессе ксеновакцинотерапии. Формирование клеточного иммунитета и его выраженность была оценена в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo*. У пациентов с положительным клиническим результатом лечения Т-клеточная положительная реакция ГЗТ регистрировалась на минимальном уровне до лечения, но в процессе лечения был зафиксирован выраженный прирост реактивности на опухолевые антигены (рисунок 2). В то время, как у больных с прогрессией заболевания на фоне вакцинотерапии прирост реакции отмечался в значительно меньшей степени.

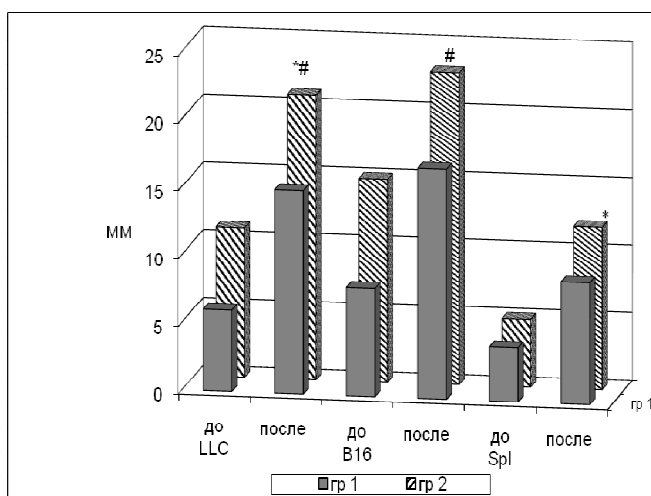


Рис.2. Кожная реакция (M±m, мм) на белковые лизаты антигенов вакцины до и после индуцирующего курса ксеновакцинотерапии у группы пациентов с колоректальным раком (n=38)
Примечание: 1-я группа, пациенты без клинического эффекта (n=15); 2-я группа, пациенты с клиническим эффектом (n=23); *-p=0,002; в сравнении с показателем до лечения; # - p =0,00; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены (критерий Манна-Уитни)

Оценка уровня сенсибилизации Т-клеток в процессе лечения. Для оценки клеточного иммунного ответа и уровня сенсибилизации к опухолевым антигенам при ксеновакцинотерапии больных колоректальным раком мы исследовали реакцию пролиферации лимфоцитов на ксеногенные (LLC, B16) и аллогенные опухолевые (BRO, Сасо-2) и контрольные АГ по включению радиоактивного тимидина в пролиферирующие клетки. Отмечено что, после индуцирующего курса пролиферативный ответ лимфоцитов на все опухолевые АГ возрастал (LLC - с 9,1 до 15,1; B16 - с 3,8 до 12,9) это закономерно для используемых при иммунизации АГ. Однако, мы зарегистрировали достоверный

пролиферативный ответ и на аллогенные, не используемые в лечении, опухолевые АГ (Сасо-2 с 1,7 до 5,9) (таблица 10).

Таблица 10. Пролиферативный ответ МНК пациентов с ККР на ксеногенные и аллогенные опухолевые и контрольные АГ

Антиген	до вакцинации (индекс пролиферативного ответа)	после вакцинации (индекс пролиферативного ответа)
Карцинома мыши (LLC) (n=12)	9,1 ± 3,16[#]	15,1 ± 2,3^{**##}
Меланома мыши (B16) (n=12)	3,8 ± 1,5	12,9 ± 1,65^{*#}
Ксеногенный контроль (спленоциты мыши) (n=12)	2,9 ± 1,15	6,0 ± 0,82[*]
Меланома человека (BRO) (n=9)	1,3 ± 0,25	1,5 ± 0,37
Аденокарцинома кишечника человека (Сасо-2) (n=9)	1,7 ± 1,5	5,9 ± 1,65[#]
Аллогенный контроль (МНК лизат) (n=9)	1,0 ± 0,7	2,8 ± 1,1

Примечание: *- $p > 0,005$; в сравнении с показателем до лечения, **- $p = 0,00$; в сравнении с показателем до лечения, #- $p > 0,05$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены, ## - $p = 0,01$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены (критерий Манна-Уитни, Statistica 6.0)

Исследование уровня цитокинов в сыворотке крови у больных колоректальным раком в процессе ксеновакциноотерапии.

До лечения и после проведения курса вакциноотерапии (через 3 месяца) в сыворотке крови пациентов был определен уровень ряда цитокинов (ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИНФ- α , ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10). (таблица 11)

Таблица 11. Динамика показателей уровня цитокинов в сыворотке крови на фоне иммуноотерапии с учетом клинического эффекта (M \pm m)

Показатели	Пациенты с клиническим эффектом (n=16)		Пациенты без клинического эффекта (n=12)	
	до	после	до	после
ИНФ-альфа, нг/мл	24,3 \pm 15,9	65,3 \pm 12,0 ($p = 0,011$) [*]	13,6 \pm 2,9	19,9 \pm 13,8
ИЛ-4	43 \pm 22,4	21 \pm 11,0	23 \pm 14,9	46 \pm 17,9
ИЛ-6	14 \pm 5,0	16 \pm 4,9	18 \pm 12,6	22 \pm 12,4
ИЛ-10	4,1 \pm 0,5	3,7 \pm 0,4	5,2 \pm 0,7	3,7 \pm 0,4
ИЛ-8	17,2 \pm 4,3	76,8 \pm 23,2 ($p = 0,004$) [*]	27,8 \pm 7,8	31,8 \pm 10,1
ФНО альфа	1,1 \pm 0,1	3,9 \pm 1,9	1,1 \pm 0,1	1,4 \pm 0,3
ИФН -гамма	35,9 \pm 11,2	183,3 \pm 40,6 ($p = 0,027$) [*]	16,7 \pm 5,3	40,8 \pm 14,1
ИЛ-1бета	1,4 \pm 0,2	3,9 \pm 2,7	1,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2

Примечание: *- достоверность рассчитана с помощью критерия Вилкоксона, (Statistica 6.0)

У больных с наличием клинического эффекта, после курса лечения мы регистрировали выраженный прирост уровня цитокинов, относящихся к классу провоспалительных (ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-1 β , ИНФ- α). У больных с прогрессирующей формой заболевания регистрировалась тенденция к увеличению ИЛ-4, остальной анализируемый спектр цитокинов (ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-4 и ИЛ-6) в процессе лечения изменялся минимально, либо имел отрицательную динамику (ИЛ-10). Таким образом, у больных с положительной

клинической динамикой течения заболевания ассоциируется повышенный уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови.

Представленные результаты исследования позволили нам сделать вывод о наличии значимых изменений в Т-звене иммунитета у больных с выраженной положительной динамикой течения патологического процесса. Однако наше исследование было бы неполным, если бы мы не проанализировали звенья иммунитета, связанные с долговременной иммунной защитой, а именно с функционированием популяций клеток относящихся к классу регуляторных (CD4+CD25+) и клеток памяти (CD4+CD45RO+, CD8+CD45RO+).

Исследование количества Т-регуляторных (CD4+CD25+) и Т-клеток памяти CD4+CD45RO+ и CD8+CD45RO+ у больных колоректальным раком в процессе ксеновакцинотерапии. Исследованиями последнего десятилетия показана значимая роль регуляторных CD4+CD25+ Т-клеток в развитии и поддержании в организме опухолевого процесса. Показано, что селективная ингибция этой популяции способствует увеличению срока выживаемости животных-опухоленосителей. В нашей работе мы определили как количество Т-регуляторных клеток, так и оценили их функциональную активность по экспрессии FoxP3 молекулы до лечения и в процессе иммунотерапии (таблица 12).

Таблица 12. Динамика изменения процентного содержания регуляторных клеток в периферической крови пациентов после проведения курса иммунотерапии с учетом клинического эффекта

	Пациенты с клиническим эффектом (n=10)		Пациенты без клинического эффекта (n=8)	
	до	после	до	после
CD4+	39,5±5,2	39,82±6,27	38,9±5,67	30,95±5,68
CD4+CD25+	4,68±1,02	2,72±0,83 (p=0,029)*	2,77±0,46	3,57±0,64
CD4+CD25+FoxP3	3,08±1,61	1,94±0,73	2,17±0,58	2,30±0,7

Примечание: *- достоверность рассчитана с помощью критерия Вилкоксона, (Statistica 6.0)

В группе больных с клиническим эффектом отмечено достоверное уменьшение содержания как CD4+CD25+, так и CD4+CD25+FoxP3+ регуляторных клеток. В группе больных с прогрессирующим течением регистрируется рост количества клеток CD4+CD25+ на фоне иммунотерапии и уменьшение общего количества CD4+ клеток. В противофазе с регуляторными клетками находятся Т-клетки памяти (CD4+CD45RO+ и CD8+CD45RO+) . У больных с выраженным клиническим эффектом в процессе лечения регистрируется прирост клеток с фенотипом CD4+CD45RO+ и общего количества CD4+ клеток. У больных с прогрессирующим течением заболевания популяции клеток как с фенотипом CD4+CD45RO+ так и с фенотипом (CD8+CD45RO+) изменяются минимально с отрицательной динамикой (табл. 12). Вероятно, этот факт является непосредственным следствием вакцинального лечения и запуска каскада иммунологических реакций, связанных со снижением иммуносупрессорной активности и заканчивающихся формированием популяции специфичных Т-клеток памяти как хелперного (CD4+CD45RO+) так и киллерного (CD8+CD45RO+) фенотипа, обладающих протективными противоопухолевыми функциями у больных с позитивной динамикой течения болезни (таблица 13). Для оценки

значимости гуморального звена иммунитета в формировании противоопухолевой защиты у пациентов с колоректальным раком, мы определяли уровень IgG антител к ОАА вакцины (карциномы и меланомы мыши) в непрямом варианте ИФА. (рисунок 3).

Таблица 13. Динамика изменения процентного содержания клеток памяти в периферической крови пациентов после проведения курса иммунотерапии с учетом клинического эффекта

	Пациенты с клиническим эффектом (n=10)		Пациенты без клинического эффекта (n=8)	
	до	после	до	после
CD4+	33.8±11.3	40.9±8.9	37.47±9.52	27.63±5.66
CD4+CD45RO+	12.1±1.7	16.8±2.3*	12.51±2.01	11.29±3.10
CD4+CD45RO+62L+	1.52±2.01	2.5±3.47	1.03±0.21	1.6±0.17
CD8+	26.4±13.9	24.5±9.7	27.19±11.25	19.40±6.74
CD8+CD45RO+	3.7±0.8	5.8±1.7	3.9±2.03	2.91±1.33
CD8+CD45RO+62L+	0.7±0.55	0.63±0.58	0.9±0.4	0.63±0.55

Примечание: *($p > 0.05$) - достоверность рассчитана с помощью критерия Вилкоксона, (Statistica 6.0 for Windows)

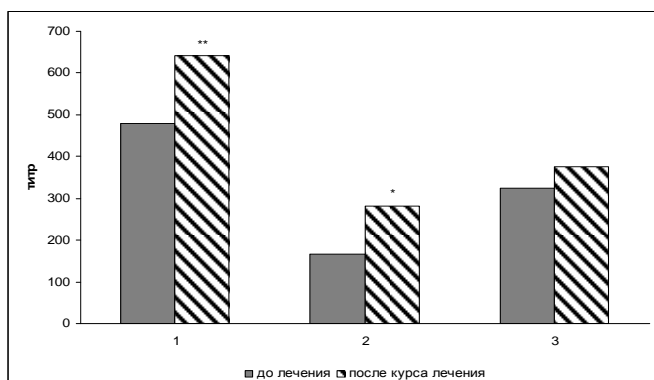


Рис. 3. Уровни антител ($M \pm m$, титр) в реакции ИФА к антигенам вакцины до и после индуцирующего курса ксеновакцинотерапии у группы пациентов с колоректальным раком (n=18). Примечание: 1-карцинома мыши; 2-меланома мыши; 3-спленоциты мыши; * - $p < 0,048$; в сравнении с показателем до лечения; ** - $p = 0,035$; в сравнении с реакцией на неопухолевые антигены (критерий Вилкоксона)

На основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что исходно высокий уровень IgG антител к антигенам карциномы и спленоцитов мыши, вероятно, связан как с предсуществующими естественными антителами к галактозильным эпитомам, представленным на поверхности клеток мыши, так и с возможным формированием в организме пациента АТ широкой специфичности, перекрестно реагирующих на любые ОАА, в том числе и ксеногенного происхождения. После проведения курса иммунотерапии мы наблюдаем дополнительное повышение титров IgG антител у пациентов с колоректальным раком к опухолеассоциированным антигенам карциномы мыши, что, вероятно, свидетельствует об индукции гуморального иммунного ответа к ОАА карциномы на фоне ксеновакцинотерапии. Далее, методом Вестернблот анализа у пациентов до- и на фоне лечения было определено наличие АТ к антигенам различного молекулярного веса (18 кДа - 125 кДа) карциномы мыши (LLC) и аденокарциномы толстой кишки человека (Colo320Hsr и Caco-2) (таблица 14).

До лечения, практически у 100% пациентов с клиническим эффектом обнаруживаются минимально определяемые АТ к аденокарциноме толстой кишки (Colo320Hsr и Caco-2) и у 83% к иммунизирующему АГ (LLC). На фоне лечения у пациентов данной группы наблюдается прирост АТ на все используемые в тесте АГ (на Colo320Hsr- у 50%, на Caco-2- у 16%, на LLC- у 33%). У пациентов с без

клинического эффекта на вакцинотерапию АТ обнаруживаются не у всех (в зависимости от АГ- от 66 до 83%), причем в процессе лечения показатели в данной группе не изменялись.

Таблица 14. Изменение состава групп пациентов в зависимости от клинического эффекта (% , пациентов в группе) и наличия антител к аллогенным антигенам до и после курса иммунотерапии

Опухолевый антиген	Группы пациентов	Доля пациентов с АТ до лечения	Доля пациентов с увеличением уровня АТ	Доля пациентов с уменьшением уровня АТ
Colo 320 hsr	С эффектом	100%	50%	0%
	Без эффекта	83%	16%	0%
Caco - 2	С эффектом	100%	16%	0%
	Без эффекта	66%	0%	0%
LLC	С эффектом	83%	33%	14%
	Без эффекта	66%	0%	0%

Таким образом, ксеновакцинотерапия индуцирует выраженные изменения в Т-клеточной системе иммунитета, причем эти изменения носят ярко выраженный разнонаправленный характер у пациентов с различным клиническим течением заболевания. Обнаруженные специфические гуморальные реакции сыворотки крови носят минимально выраженный характер, но различаются у больных с различным течением патологического процесса.

ВЫВОДЫ

1. Отсутствие серьезных нежелательных реакций, достигнутая клиническая эффективность на уровне 42% и увеличение медианы выживаемости пациентов с диссеминированной формой колоректального рака в 2,8 раза относительно группы сравнения, свидетельствует о безопасности и эффективности ксеновакцинотерапии.
2. Развитие клинического ответа у пациентов ответивших на вакцинотерапию ассоциируется с выраженным пролиферативным ответом на аллогенные опухолевые клетки карциномы Caco-2, превышающим значения до вакцинотерапии в 3,47 раза, что свидетельствует о высокой степени гомологии опухолюассоциированных антигенов и формировании в организме больного Т-клеточных перекрестных иммунных реакций на ксеногенные и аллогенные опухолевые антигены.
3. Достоверное увеличение концентрации ИФН-альфа, ИЛ-8 и ИФН-гамма в сыворотке крови у пациентов ответивших на вакцинотерапию указывает на формирование иммунного ответа преимущественно клеточного типа.
4. У больных с наличием ответа на вакцинотерапию выявлено уменьшение количества CD4+CD25+FoxP3+ регуляторных Т-клеток, что свидетельствует об ослаблении опухолюиндуцированной иммуносупрессии.
5. Усиление реакции ГЗТ на вакцинальные антигены и увеличение процентного содержания CD4+CD45RO клеток памяти у пациентов ответивших на вакцинотерапию указывает на развитие антигенспецифического иммунного ответа и формирование долгосрочной противоопухолевой иммунологической памяти.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Шишков А.А., Шишкова И.В., Демченкова М.В., Кащенко Э.А., Савкин И.В., Селедцова Г.В. «Влияние специфической ксеновакциноотерапии на цитокиновый спектр в периферической крови пациентов с IV стадией колоректального рака.» // Всероссийская научная конференция «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии. Новосибирск, 15-17 сентября 2010г. // Цитокины и воспаление. 2010-т.9-№3-с 83.
- 2) Шишков А.А., Селедцова Г.В., Белгородцев С.Н., Кащенко Э.А., Суровцева М.А., Демченкова М.В. Ксеновакциноотерапия в лечении пациентов с колоректальным раком III –IV стадии заболевания. // Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» 1-3 марта 2010.- с.275.
- 3) Шишков А.А., Кащенко Э.А., Белгородцев С.Н., Селедцова Г.В. Динамика цитокинового профиля у онкологических больных на фоне специфической противоопухолевой вакциноотерапии. // Материалы VIII отчетной конференции НИИ КИ СО РАМН. Новосибирск.-2011.-С. 137-139.
- 4) Шишков А.А., Суровцева М. А., Селедцова Г.В., Селедцов В.И., Козлов В.А. Влияние специфической вакциноотерапии на продолжительность жизни пациентов с диссеминированным раком кишечника. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2009. №2/1(24) 232-235
- 5) Суровцева М.А., Ница Н.А., Самарин Д.М., Шишков А.А., Повещенко О.В., Кащенко Э.А., Селедцов В.И., Селедцова Г.В. Ксеновакцинация в лечении колоректального рака.// Материалы VII отчетной конференции ГУ НИИ КИ СО РАМН. Новосибирск-2006.-Стр.281-282.
- 6) Фельде М.А., Самарин Д.М., Ница Н.А., Шишков А.А., Кащенко Э.А., Селедцов В.И., Селедцова Г.В., Козлов В.А. Оценка клеточной иммунореактивности при ксеновакциноотерапии пациентов с IV стадией колоректального рака. **Медицинская иммунология. 2006,Т8,(1): 67-72.**
- 7) Бухтояров О. В., Шишков А.А. [и др.] // Психоиммунологические эффекты гипносуггестивной психотерапии больных онкологическими заболеваниями (предварительные результаты) // **Российский психиатрический журнал. - 2007. - № 1. - С.64-70. - Библиогр.: с. 69-70.**
- 8) Кащенко Э. А., Самарин Д. М., Селедцова Г. В., Шишков А.А., Повещенко О.В. Исследование эффективности применения специфической и неспецифической иммунотерапии у мышей-опухоленосителей при гипертермическом воздействии // **Медицинская иммунология.-2007.-Т.9.-С.143-144.**
- 9) Савкин И.В., Шишков А.А., Ница Н.А. Психодинамические паттерны онкологических пациентов. // **Вестник Новосибирского Государственного Университета. Серия: Психология. – 2010. – Т. 4, № 1. – С. 60-63.**
- 10) Селедцов В.И., Фельде М.А., Самарин Д.М., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Ница Н.А., Тюрюмин Я.Л., Кащенко Э.А., Повещенко О.В., Козлов В.А. Иммунологические и клинические аспекты применения ксеновакциноотерапии в лечении меланомы. **Российский онкологический журнал. 2006; № 4 : 23-29.**
- 11) Суровцева М.А., Шишков А.А., Селедцова Г.В., Козлов В.А., Клинико-иммунологическая эффективность вакциноотерапии при диссеминированной меланоме кожи // **Сибирский онкологический журнал. 2009. №6 (36) с12-18.**
- 12) Bukhtoiarov OV, Kozhevnikov VS, Shishkov AA, Seledtsov VI, and Kozlov VA // [Psychological and immunological defenses in cancer--the two aspects of one problem] **Vopr Onkol, Jan 2005; 51(6): 703-7.**
- 13) Seledtsov V.I., Shishkov A.A., Seledtsova G.V. // Current Cancer Treatment - Novel Beyond Conventional Approaches. InTech, December, 2011; 415-428.

- 14) Seledtsov VI, Niza NA, Felde MA, Shishkov AA, Samarin DM, Seledtsova GV, and Seledtsov DV // Xenovaccinotherapy for colorectal cancer. **Biomed Pharmacother**, Feb 2007; **61(2-3): 125-30.**
- 15) Seledtsov VI, Shishkov AA, Surovtseva MA, Samarin DM, Seledtsova GV, Niza NA, and Seledtsov DV // Xenovaccinotherapy for melanoma. **Eur J Dermatol**, Nov 2006; **16(6): 655-61.**