

# Эффективность комплексного лечения рака шейки матки с применением вируса болезни Ньюкасла

Кешелава В. В., Добровольская Н. Ю., Ставицкий Р. В.<sup>1</sup>,  
Погольская М. В., Квиникадзе Р. Д.

ФГУ Российский научный центр Рентгенорадиологии Росмегтехнологий, г. Москва.

## Efficiency of complex treatment of cervical cancer with application of oncolytic virus of Newcastle disease

Keshelava V. V., Dobrovolskaya N. U., Stavitskiy R. V., Podolskaya M. V., Kvinikadze R. D.

### Реферат

Представлены результаты лечения 13 больных раком шейки матки стадий T16-36N0-1M0, которым в плане комплексного лечения проводились инъекции онколитического вируса болезни Ньюкасла. Оценены непосредственные и отдаленные результаты, токсические реакции и динамика иммунологического статуса. Полученные в работе данные позволяют проводить дальнейшие исследования терапевтического потенциала вируса болезни Ньюкасла и разрабатывать оптимальные режимы и схемы лечения.

**Ключевые слова:** вирус болезни Ньюкасла, рак шейки матки.

### Abstract

Results of treatment of 13 cervical cancer patients of stages T16-36N0-1M0 which in respect of complex treatment injections of a oncolytic virus of Newcastle disease were spent are presented. The analysis nearest and remote results, toxic reactions and dynamics of the immunologic. The data obtained in work allows to conduct the further researches of therapeutic potential of oncolytic virus of Newcastle disease and to develop optimum modes and treatment schemes.

**Keywords:** cervical cancer, virus of Newcastle disease.

*«Если женщина умирает от рака шейки матки,  
то кто-то еще, кроме рака, повинен в ее смерти»  
Ч. Камерон, 1964 г.*

В мире рак шейки матки (РШМ) по частоте встречаемости занимает ведущие позиции в структуре гинекологических злокачественных новообразований [6]. Большинство случаев местнорас-

пространенного РШМ диагностируется в тех странах, где недоступны регулярные программы скрининга.

В нашей стране на протяжении последних 30 лет отмечается постепенное

<sup>1</sup>Ставицкий Роман Владимирович, профессор, д. т. н., ФГУ Российский научный центр рентгено-радиологии, тел.: +7 (495) 333-81-71.

снижение заболеваемости РШМ на фоне внедрения активных скрининговых программ.

Так, в 90-х годах РШМ в структуре общей онкологической заболеваемости занимал 4-е место, в то время как в 1975 г. он занимал 3-е место, а в 60-е годы – первое [19]. Несмотря на разработку новых программ комплексного лечения РШМ и использование современных цитотоксических препаратов, смертность на первом году с момента установления диагноза составляет 20,3 % [19], а пятилетняя выживаемость при местнораспространенном раке шейки матки не превышает 50 % [13]. Это диктует необходимость разработки новых и совершенствование существующих методов лечения.

Одним из перспективных компонентов противоопухолевых программ является использование методов лечения, направленных на коррекцию иммунологической системы онкологических больных. Опухолеассоциированный иммунодефицит достоверно коррелирует со степенью распространенности первичной опухоли, поражением регионарных лимфатических узлов и наличием отдаленных метастазов при различных локализациях рака, в том числе и РШМ [14].

Л. И. Декстер с соавторами исследовали показатели иммунологического статуса у 100 больных РШМ I-III стадий [11]. Анализ зависимости иммунной компетентности от стадии опухолевого процесса показал ее угнетение, начиная с Ib стадии, и нарастание по мере распространенности опухоли. Так, нормальная иммунограмма наблюдалась у 90 % больных преинвазивным РШМ, но в I б стадии только у 40%, во II стадии – у 10 %, а в III стадии ни у одной больной. Кроме того, применяемые схемы хими-

олучевого лечения, в свою очередь, оказывают угнетающее действие на иммунологическую реактивность организма.

Из всего арсенала предложенных иммунотерапевтических средств в настоящее время в клинической практике нашли применение интерферон альфа и БЦЖ [10].

Среди новых иммуноопосредованных методов противоопухолевой терапии ведущую позицию сейчас занимает виротерапия. Впервые феномен вирусного онкотропизма описан в 1912 г, когда была опубликована статья, описывающая случай регрессии рака шейки матки у женщины, которой после укуса собаки ввели вакцину, изготовленную из ослабленного вируса бешенства [1]. В последующие годы у многих других вирусов, в том числе и у вируса болезни Ньюкасла (ВБН), обнаруживался противоопухолевый потенциал. Проведенные исследования демонстрируют, что опухолевые клетки могут быть уничтожены непосредственно вирусом или косвенно через активацию иммунной системы, включая атаку цитотоксическими клетками (натуральные киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты), выработку антител, освобождение цитокинов [3,9,10]. Противоопухолевая активность ВБН доказана многочисленными лабораторными и клиническими исследованиями в США, Германии, Венгрии [2,4]. По данным пилотных клинических исследований применение терапии ВБН на 15% эффективнее, чем стандартное химиотерапевтическое воздействие [7,8].

В РНЦРР с 2005 г проводится изучение противоопухолевой активности ВБН (штамм La Sota) у больных различными злокачественными новообразованиями: раком молочной железы, меланомой, раком толстой кишки,

РШМ, раком яичников [16]. Результаты проведенных исследований II-III фазы исследований продемонстрировали безопасность, высокий уровень объективного ответа, хорошую переносимость и экономическую эффективность этого метода лечения [12,15].

Цель данной работы состоит в оценке эффективности схем комплексного лечения РШМ с использованием ВБН.

### Материалы и методы

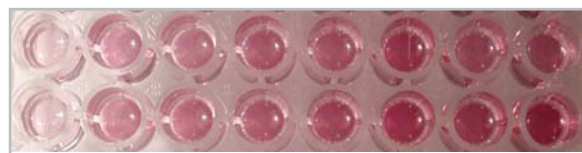
В клиническое исследование за период 2006-2010 гг. включено 13 больных РШМ стадий IV-IIIВ (T16-36N0-1M0). У 12 больных при гистологическом исследовании диагностирован плоскоклеточный рак, у одной больной - аденокарцинома. Больные были в возрасте от 33 до 69 лет ( в среднем  $47 \pm 11,7$  лет).

Препарат вируса болезни Ньюкасла (ВБН) изготавливался из живого вируса штамма La-Sota, безвредного для млекопитающих и вакцинного для птиц (сертификат соответствия: № РОСС RU. ФВ.В16890 75214). Для парентерального введения ВБН очищался от белков и солей аллантоисной жидкости. Длительное сохранение жизнеспособности вируса достигалось его лиофилизацией в стабилизирующем растворе с последующим хранением в вакууме или атмосфере инертного газа. Все операции по очистке и лиофилизации вируса проводились в условиях асептики и с соблюдением правил работы с инфекционным материалом. Готовый препарат контролировался на специфическую активность, отсутствие контаминации посторонней микрофлорой и безвредность для человека.

Для определения цитотоксической активности препаратов вируса использовались монослойные культуры адге-

зивных опухолевых клеток человека — линии меланомы или аденокарциномы. Клетки выращивались в 96-луночных культуральных планшетах в среде RPMI-1640 или ДМЕМ с 10 % эмбриональной сыворотки коров при 37°С в CO<sub>2</sub> инкубаторе с 5,0 % CO<sub>2</sub>. Состояние клеток оценивали, просматривая планшеты в инвертированном микроскопе. При образовании на дне лунок сплошного монослоя, клетки заражали вирусом в разведениях от 1:10<sup>-4</sup> до 1:10<sup>-10</sup>. Для этого среду в лунках заменяли на соответствующее разведение вируса в той же самой среде без сыворотки. Через 48 часов живые клетки окрашивали МТТ реагентом (Sigma) согласно инструкции производителя. Результат оценивали визуально (рис. 1).

Титром вируса на культуре клеток яв-



*Рис. 1. Визуальное определение цитотоксической активности препарата ВБН.*

лялось разведение, вызывающее достоверный цитотоксический эффект – 10<sup>-8</sup> для данного препарата.

Количественно результат регистрировали с помощью ELISA-ридера при длине волны 450 нм (рис. 2).

В качестве компонента неоадъювантной терапии инъекции ВБН выполнялись 4-м больным. 9 пациентам вирус вводился одновременно с программой комплексного лечения.

Инъекции препарата ВБН произво-

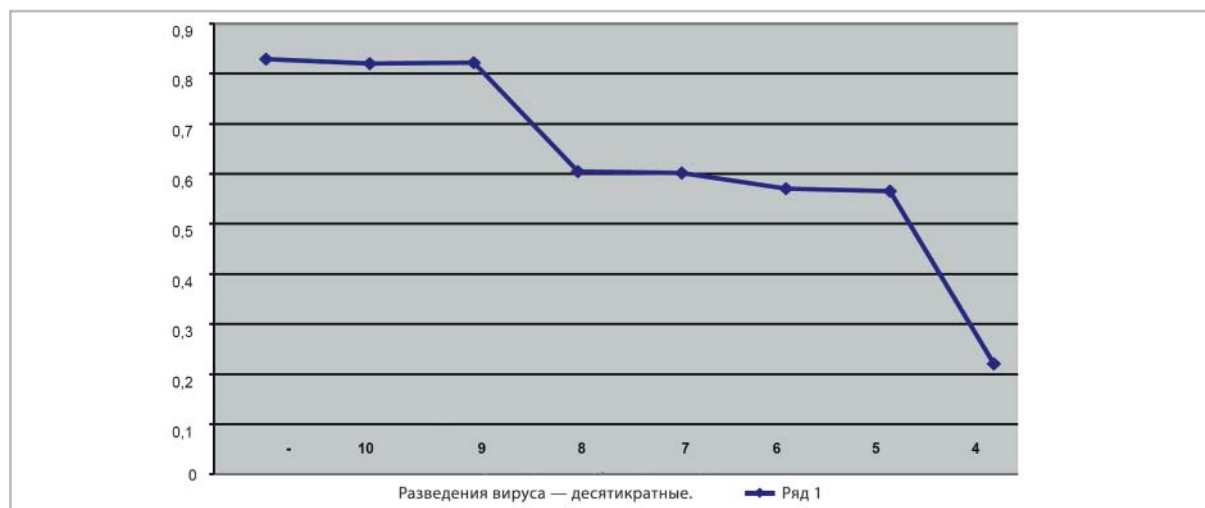


Рис. 2. Количественное определение цитотоксической активности препарата ВБН с помощью ELISA-ридера при длине волны 450 нм.

дились внутривенно в область передней брюшной стенки в дозе  $10 \cdot 9$  микробных тел с интервалами 7-10 дней. При сочетании с химиотерапией ВБН вводился за сутки до начала цитостатической терапии. После завершения основной программы лечения проводилась поддерживающая терапия – инъекции ВБН с интервалом 3-5 недель.

Комплексное лечение включало:

- 2-6 курсов полихимиотерапии на основе препаратов платины;
- дистанционную и внутриволостную лучевую терапию;
- хирургическое лечение в объеме расширенной экстирпации матки с придатками или с транспозицией яичников.

### Результаты исследования и обсуждение

Оценка результатов исследования проводилась на основе данных гинекологического осмотра, ультразвукового

исследования, магнитно-резонансной томографии. Степень лекарственного патоморфоза оценивалась в соответствии с классификацией Н.Н. Шиукашвили (1974): 4 степень соответствует полному патоморфологическому ответу (отсутствие опухолевых клеток, как в первичной опухоли, так и в лимфатических узлах), 3 степень – определяют остаточные инвазивные опухолевые клетки – минимальная микроскопическая остаточная опухоль, 2 степень – макроскопически остаточная опухоль.

Оценка эффективности лечения выполнялась в соответствии с критериями RECIST. Токсичность проводимого лечения оценивалась в соответствии со шкалой токсичности NCIC.

В группе больных, которые получали лечение ВБН в рамках неoadъювантной терапии, частичный ответ наблюдался у 3-х больных (75 %), стабилизация – у одной больной (25 %). Терапевтический патоморфоз 2 степени зафиксирован у 3

больных (75 %), у одной больной (25 %) терапевтический патоморфоз соответствовал 3 степени. Прогрессирование заболевания выявлено у 3 больных, время до прогрессирования составило 7,2 месяца.

В группе больных, у которых ВБН применялся в сочетании с традиционными схемами комплексного лечения РШМ, получены следующие результаты. У 4 больных (44,4 %) зафиксирован полный ответ, у 4 больных (44,4 %) — частичный ответ, у одной больной (11,1 %) выявлено прогрессирование заболевания на фоне проводимого лечения.

Сроки наблюдения составили от 2 до 44 месяцев, медиана наблюдения — 14 месяцев, среднее время до прогрессирования — 11,7 мес. Безрецидивная выживаемость — 44,4 %, общая выживаемость — 66,7 %.

Применение ВБН сопровождалось лихорадкой, локальной кожной реакцией и кратковременным ухудшением общего самочувствия. Лихорадка 1-2 ст. (по критериям NCIC) продолжалась в течение суток и купировалась приемом жаропонижающих препаратов. Кожная реакция в виде папулы с ободком гиперемии в месте введения отмечалась как при первичном, так и при повторных введениях вакцины, стихала в течение нескольких дней после вакцинации и не требовала дополнительного лечения. Случаев токсичности, требующих прекращения лечения, не отмечено. Важно подчеркнуть, что применение ВБН не влияло на сроки реализации химиолучевого и хирургического лечения. Показано, что использование ВБН в неoadъювантной терапии РШМ не влияет на ход операции и частоту развития послеоперационных осложнений.

Динамика иммунологического статуса изучена у 7 больных. Основные

иммунологические характеристики оценивались по уровню экспрессии поверхностных антигенов на лимфоцитах периферической крови методом проточной цитофлуорометрии с использованием моноклональных антител.

Рядом исследований продемонстрировано, что применение ВБН сопровождается рядом иммунологических реакций, затрагивающих как Т-, так и В-клеточное звено. Kirn с соавт. показали, что если иммунная система отвечает на зараженные вирусом опухолевые клетки, то впоследствии будет лучше происходить распознавание специфических раковых антигенов, а также возрастает способность убивать незараженные раковые клетки.

До начала виротерапии изменения в иммунологическом статусе отмечены у 57,1 % (4) больных, что выражалось в снижении показателей CD3CD4, NK-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов. После окончания комплексного лечения, несмотря на полученные высокие показатели объективного ответа, выявленная раннее тенденция к снижению иммунологической реактивности сохранялась. Однако на фоне ежемесячных поддерживающих инъекций ВБН уже через 3 месяца у 71,4 % (5) больных отмечено повышение уровня CD3CD8 (Т-киллеры/супрессоры), у 57,1 % (4) — CD19 (В лимфоциты). Таким образом, можно констатировать, что применение ВБН сопровождается активацией как гуморального, так и клеточного звена иммунитета. Однако для более точной оценки иммуногенности ВБН необходимо исследование развернутого иммунологического статуса на большем количестве больных, определение уровня интерферонов альфа и гамма, фактора некроза опухолей альфа.

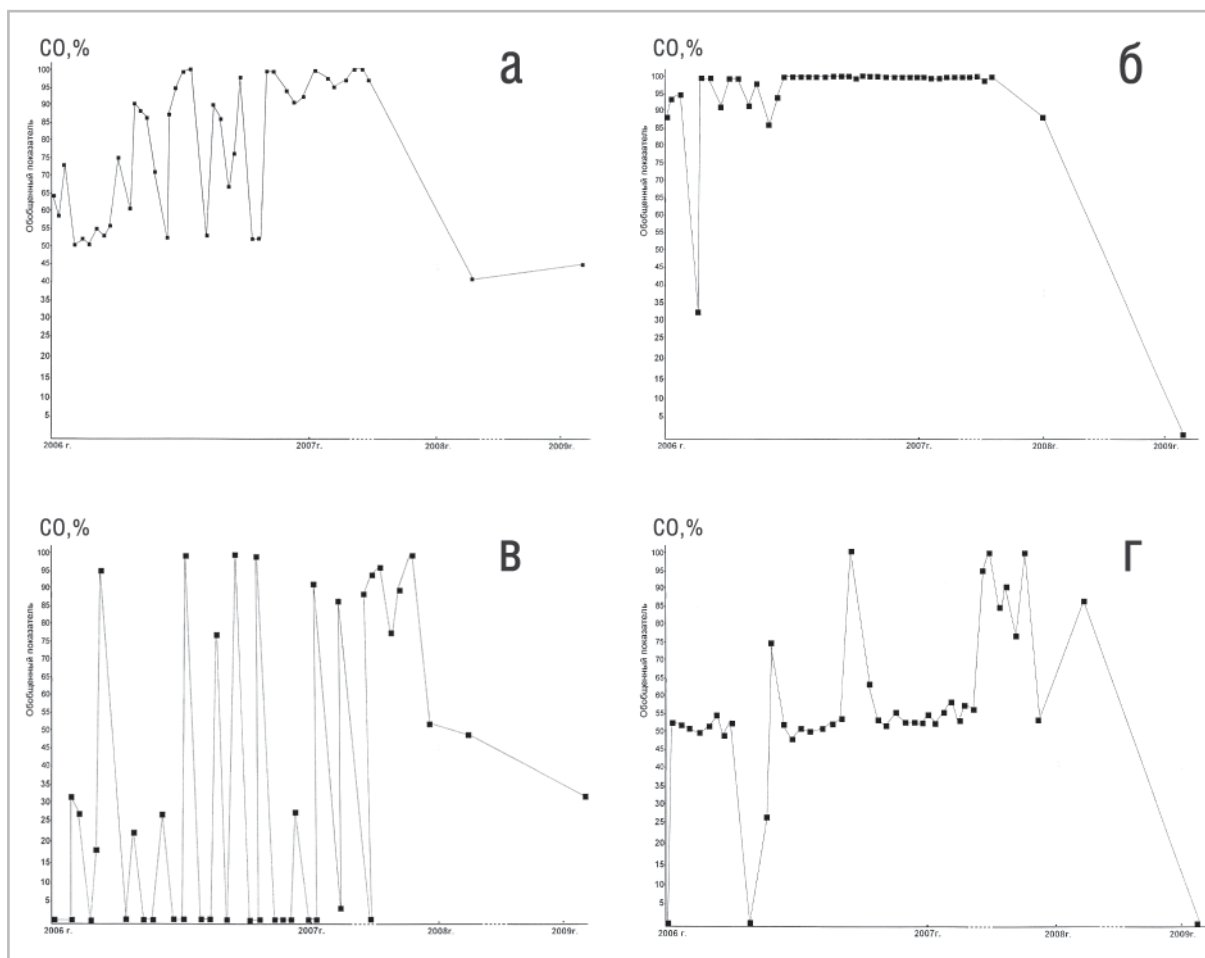


Рис. 3. Динамика оценки состояния организма (а), урологической системы (б), гинекологической системы (в) и пищеварительного тракта (г). (СО – Состояние организм в %).

Таким образом, достигнутые в настоящее время показатели выживаемости больных распространенными формами РШМ при традиционных методах лечения нельзя признать удовлетворительными, что диктует необходимость поиска принципиально новых путей воздействия на опухолевый рост.

Комплексное лечение РШМ с использованием ВБН является эффективным и безопасным методом: общая эффективность лечения составила 84,6 %, а токсические реакции, связанные с применением

ем ВБН, не превысили 1-2 ст. Несмотря на то, что проведенное исследование основано на малом количестве больных, полученные результаты представляются многообещающими, что позволяют проводить дальнейшие рандомизированные исследования по изучению роли ВБН в комплексном лечении злокачественных новообразований различных локализаций.

В процессе проведения лечения больной Г. (48 лет) после окончания хирургического лечения, лучевой и химиоте-

рапии был продолжен курс активной специфической иммунотерапии с использованием ВБН. Динамические кривые изменения состояния организма и его систем приведены на рис. 3.

Очевидно, что на начальном этапе наблюдается умеренная гомеостатическая активность, которая спустя 1-2 года переходит в положительную реакцию организма и его систем. Оценка динамических кривых проводилась по многочисленной обработке показателей периферической крови методом АКС энофит [17,18].

Этот метод позволяет относить состояние организма и его систем по четырем классам:

- здоровье — 0-20 %;
- слабое отклонение состояния — 21-40 %;
- сильное отклонение состояния — 41-70 %;
- состояние, близкое к терминальному — 71-100 %.

Из рис. 3 видно, что к 2009 году (через два года после начала лечения) состояние организма слабо отклонялось от нормы (1 %), состояние гинекологической системы слабо отклонено от нормы, а состояние пищеварительного тракта в норме (0 %).

Следует отметить, что больная перенесла тяжелый курс лучевой терапии (контактное и дистанционное облучение), в результате чего несколько ухудшено состояние организма и гинекологической системы.

Многолетний опыт контроля состояния больных, которым не проводился курс виротерапии, не давал ни единого случая такого эффекта выздоровления, как после применения ВБН.

## Список литературы

1. Ahlert T: Tumor cell vaccination and IL-2 therapy // *Hybridoma*, 12 (5).- 549.- 1993.- P.34.
2. Anton P, Kirchner H, Jonas U, et al.: Cytokines and tumor vaccination. *Cancer Biother Radiopharm*, 11 (5): 315-8, 1996.
3. Batliwalla FM, Bateman BA, Serrano D, et al.: A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire. *Mol. Med*, 4 (12): 783-94, 1998.
4. Csatory LK, Bakács T: Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. *JAMA*, 281 (17): 1588-9, 1999.
5. Fábíán Z, Tórócsik B, Kiss K, et al.: Induction of apoptosis by a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Anticancer Res.*, 21 (1A): 125-35, 2001 Jan-Feb.
6. Ferlay J. GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base, 2004.
7. Phuangsab A, Lorence RM, Reichard KW, et al.: Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: antitumor effects of local or systemic administration. *Cancer, Lett* 172 (1): 27-36, 2001.
8. Schirmacher V, Bai L, Umansky V, et al.: Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity. *Int J Oncol.*, 16 (2): 363-73, 2000.
9. Zorn U, Dallmann I, Grosse J, et al.: Induction of cytokines and cytotoxicity against tumor cells by Newcastle disease virus. *Cancer Biother*, 9 (3): 225-35, 1994 Fall.

10. Васильев Б. В. с соавт. Опыт клинического применения человеческого лейкоцитарного интерферона при раке шейки матки // Вопр. Онкол. 1986. Т. 32, № 12., С. 23-28.
11. Декстер Л. И. с соавт. Изменения иммунологических параметров у больных раком шейки матки под воздействием полипептидного препарата тимуса (тималин) // Иммунология опухолей. — Рига: Зинатие, 1982. С.150-152.
12. Кешелава В. В., Добровольская Н. Ю., Подольская М. В., Гармарник Т.В. Возможности применения онколитического вируса болезни Ньюкасла в неoadъювантной терапии рака молочной железы // Вестник Российской ассоциации радиологов., 2009. №1. С. 171-172.
13. Кравец О. А. Результаты лучевой терапии местно-распространенного рака шейки матки (обзор литературы) // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН., 2008. Т. 19, № 3. С. 4–10.
14. Максимов С. Я., Гусейнов К. Д. Комбинированное лечение рака шейки матки // Практическая онкология.— Т. 3, №3-2002. С.200-206.
15. Подольская М. В. Онколитический вирус болезни Ньюкасла в неoadъювантной терапии рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал, 2008. Приложение №1. С.10.
16. Подольская М. В. Органосохраняющее хирургическое лечение рака молочной железы с применением онколитического вируса болезни Ньюкасла // канд. дис. — Москва.— 2009.
17. Ставицкий Р. В. с соавт. Медицинская рентгенология: технические аспекты, клинические материалы, радиационная безопасность. М-МНПИ., 2003. С.108-134.
18. Солодкой В. А., Савицкий Р. В. Методы визуализации и контроля организма и его систем. М.: ГАРТ, 2009. С. 178-205.
19. Чиссов В. И., Старшинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2006 году (заболеваемость и смертность). М., 2008. С. 248.