

**«Затверджую»**

**Головний лікар**

**Київського міського  
онкологічного центру**



**О.М. Ключов**

## **З В І Т**

**за темами: «Дослідження впливу Доновіту-ВС на клітинний,  
гуморальний та неспецифічний імунітет у хворих на рак  
яєчників»**

**«Дослідження впливу Доновіту-ВС на клітинний, гуморальний  
та неспецифічний імунітет у хворих на рак молочної залози»**

**КИЇВ**

*Черненко О.Д., Муріна В.В., Корень Т.М., Самойленко С.В.*

## **Дослідження впливу Доновіт-ВС на клітинний, гуморальний та неспецифічний імунітет у хворих на рак яєчників**

### **I. Вступ**

Захворювання населення України злоякісними новоутвореннями, як і у всіх економічно розвинутих країнах світу, характеризується стабільним ростом. Злоякісні новоутворення займають друге місце (13%) в загальній структурі смертності населення України після серцево-судинних (60%) захворюваннях.

Рак яєчників (РЯ) є однією із найбільш поширених форм новоутворень і займає четверте місце в структурі захворюваності серед жінок.

Незважаючи на досягнуті успіхи в лікуванні хворих на рак яєчників смертність від цього захворювання все ще залишається високою і склала в 2008 році 20,5 чоловік на 100 000 жіночого населення.

Неухильне зростання захворюваності, незадовільні результати лікування хворих на рак яєчників із-за часто розвиваючої резистентності до цитостатиків і великий ризик рецидування, навіть при ранніх стадіях захворювання, зумовлює пошук нових підходів і напрямків лікування і пошук нових препаратів, які мали б імунозміцнюючу та онкопротекторну дію. Одним з таких напрямків є імунотерапія.

Імунотерапія в лікуванні онкологічних хворих - досить новий напрямок в світовій онкології. Однак, він вже встиг зарекомендувати себе, як прогресивний. Сьогодні імунотерапія досить активно досліджується та застосовується українськими онкологами.

Серед багатьох препаратів з імунозміцнюючою дією нашу увагу привернув новий український препарат рослинного походження, який володіє імунозміцнюючою та онкопротекторною дією — Доновіт-ВС. Він показав свою онкопротекторну дію при ряду пухлин, але даних про застосування даного препарату при злоякісних захворюваннях яєчників в доступній літературі ми не знайшли.

Саме тому метою нашого дослідження було вивчення імунного статусу у хворих на рак яєчників при включення в комплексне протипухлинне лікування препарату рослинного походження Доновіт-ВС.

#### **Задачі дослідження:**

1. вивчити показники клітинного імунітету у пацієток, хворих на рак яєчників з включенням в схему лікування Доновіт-ВС;
2. вивчити показники гуморального імунітету у пацієток, хворих на рак яєчників з включенням в схему лікування Доновіт-ВС;
3. дослідити показники неспецифічної резистентності у пацієток хворих на рак яєчників.

**Об'єкт дослідження:** жінки, хворі на рак яєчника.

**Методи дослідження:** загально клінічний, гістологічний, цитофлюорометричний, імунологічний та статистичний.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати досліджень дають можливість рекомендувати препарат Доновіт-ВС для включення в комплексну схему протипухлинного лікування хворих на рак яєчників.

## II. Матеріали і методи

### 2.1. Характеристика клінічного матеріалу

Дослідження, результати якого викладені у роботі, проведені на базі відділення імунології та гінекології Київської міської онкологічної лікарні (КМОЛ). Матеріалами дослідження були результати імунологічного обстеження 30 жінок, хворих на рак яєчників, які лікувалися протягом 2008-2009 років в гінекологічному відділенні КМОЛ. Контрольну групу склали 8 практично здорових жінок, які добровільно обстежувались на імунологічний статус в відділенні імунології. Середній вік жінок контрольної групи склав  $45,5 \pm 1,5$  рік. Середній вік пацієток становив  $62,9 \pm 0,8$  років (див. таб. 2.1.)

Таблиця 2.1

#### Розподіл клінічної групи хворих РЯ за віком

Групування по десятиріччям	Кількість (%)	Середній вік хворих в групі
45-55	5(16,7)	$52,2 \pm 1,5$
56-66	13 (43,3)	$62,2 \pm 0,5$
66-76	12(40,0)	$74,1 \pm 0,6$
Всього	30(100,0)	$62,9 \pm 0,8$

При обстеженні пацієток указаних груп застосовували загально клінічні і лабораторні методи досліджень. В таблиці 2.2. представлені методи досліджень і кількість обстежених жінок.

Таблиця 2.2.

#### Методи дослідження і кількість обстежених хворих

Методи дослідження	Кількість жінок
Загальноклінічні	30
Гістологічний	30
Імунологічні	38
Цитофлюорометричний	38
Статистичний	38

У більшості хворих (56-76 років) (табл. 2.3.) діагностовано РЯ II та III стадії за класифікацією FI GO пухлинного процесу, у 5 (16,7%) виявлено I стадію захворювання. Крім комплексного обстеження хворим на РЯ було проведено комплексне лікування (згідно міжнародних стандартів), яке вимагало: радикальне оперативне втручання (екстирпація матки з придатком, оментектомія) з ад'ювантною хіміотерапією (табл. 2.4.), частині хворих проводили аналогічне лікування + імунотерапію новим українським препаратом з протипухлинною та імунозміцнюючою дією (табл. 2.4.).

Згідно плану досліджень проведено інтраопераційний забір пухлинного матеріалу та підбір парафінових блоків видалених пухлин поточного та ретроспективного аналізу. Гістологічне дослідження пухлин яєчника проводилось лікарями патологоанатомічного відділення КМОЛ. Опрацьовано історії хвороб, амбулаторні картки, матеріали канцер-реєстру. Спостереження за пацієнтами після лікування проводилось у відділенні онкогінекології КМОЛ (табл.2.3).

Таблиця 2.3.

Клінічні параметри		Кількість пацієток %
Стадія захворювання	I	5(16,7)
FI GO	II	10(33,3)
	III	15(50,0)
	Всього	30(100,0)
Гістологічний тип РЯ	Серозний	6 (20,0)
	Ендометріозний	4(13,3)
	Муцинозний	3(10,0)
	Світло клітинний	3 (10,0)
	Серозний папілярний	5(16,7)
	Недиференційований	9(30,0)
	<b>Всього</b>	<b>30</b>

Таблиця 2.4.

#### Тип лікування пацієнтів з РЯ

Проведене лікування	Кількість пацієток %
Оперативне + хіміотерапія	10(33,3)
Оперативне + хіміотерапія + імунотерапія	20 (66,7)
<b>Всього</b>	<b>30(100,0)</b>

## **2.2. Метод гістологічного дослідження пухлин яєчника.**

Морфологічне дослідження проводили після оперативного втручання. Згідно класичної гістологічної методики обробки тканин застосовували фіксацію в 10% розчину формаліну і парафінову проводку. Гістологічні зрізи товщиною 5-6 мкм фарбували гематоксиліном і еозином.

Після огляду гістологічних препаратів під мікроскопом визначали гістологічну будову і ступінь диференційованих пухлин. Для характеристики морфологічної структури злоякісних новоутворень яєчників використовували гістологічну класифікацію пухлин (ВОЗ, № 9, 1973).

## **2.3. Методика дослідження клітинного імунітету.**

Протягом останніх 30 років найбільш важливими показниками кількісної характеристики популяції Т- та В- лімфоцитів вважалися кількість Е розеткоутворюючих клітин та Е<sub>м</sub> розеткоутворюючих клітин, метод визначення яких базується на факті наявності поверхневих рецепторів лімфоцитів до гетерологічних еритроцитів. Для Т-лімфоцитів це еритроцити барана (Е - РУК), для В-лімфоцитів - еритроцити миші (Е<sub>м</sub> - РУК)

Відкриття гібридної технології отримання моноклональних антитіл та впровадження в широку практику клініко-діагностичних лабораторій автоматичного аналізу на базі кількісної протокової цитофлюориметрії сприяло поступовому витісненню «розеткових» тестів.

Тепер антигени CD3+ (Т-лімфоцити) та CD19+ (В-лімфоцити, разом із CD4+ Т-лімфоцитами-хелпери/індуктори), CD8+ (Т-лімфоцитсупресори/цитотоксичні), CD16+ та CD56+(натуральні кілери) є основними маркерами для кількісної оцінки популяційного та субпопуляційного складу лімфоцитів, за їх експресією судять про те, наскільки лімфоцит здатен регулювати процеси своєї активації та ефекторні функції.

Імунофенотип лімфоцитів (СВ3+Т-лімфоцити, CD19+-В-лімфоцити, CD16+ CD56+ -НК-клітини, оцінювали згідно з рекомендаціями фірми «Becton Dickinson Immunocytometry Systems», США з використанням двопараметрового цитофлюориметричного аналізу, панелі прямо мічених моноклональних антитіл.

Вимірювання здійснювали на протоковому цитофлюориметрі «FACS can», що обладнаний аргонним лазером (488 нм), використанням комерційної програми «СМ Quest» (тієї ж фірми). Аналіз клітин у зразку проводили в гейті лімфоцитів за 4 параметрами: інтенсивність прямого та бокового світлорозсіювання, флюоресценції ФІТУ та ФЕ. Для виміру флюоресценції по ФІТУ використовували вузькосмужкові фільтри розміром 530/30 нм, ФЕ-575/26 нм, потужність лазера складала 100мВ.

## **Методика визначення поверхневих маркерів лімфоцитів з використанням моноклональних антитіл (МКА).**

1. МКА розводили азидом Na (0,1 % розчин) у співвідношенні 1:3, зберігали в холодильнику протягом 1-2 місяців.

2. У пластикові пробірки розкапали по 5 мкл МКЛ (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+).
3. В кожну пробірку вносили по 20 мл генаризованої крові, перемішували та інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі.
4. В кожну пробірку додали 70-80мл лікуючого розчину на 5-10 хвилин.
5. Провели підрахунок досліджуваних кластерів лімфоцитів на цитофлюориметрі.

#### **Методика оцінки фагоцитуючої здатності і нейтрофільних гранулоцитів.**

В основі методу лежить здатність нейтрофілів крові поглинати і переварювати мікроби і характеризує їх функціональну активність.

**Реактиви:** ізотонічний розчин натрію хлориду (стерильний), суспензія убитих мікробів стафілокока (*Stafilococcus aureus* - штам 209).

Для приготування суспензії мікробів у пробірку або чашку Петрі з одноденною культурою стафілокока наливали невелику кількість ізотонічного розчину хлориду натрію, перемішували і розведену культуру піпеткою переносили у хімічну пробірку. Цю пробірку ставили на водяну баню та активували *Stafilococcus aureus* при температурі 90°C протягом 1 години. Потім вміст пробірки доводять до ступеня мутності бактеріального стандарту з концентрацією 1-5 x 10<sup>3</sup> мікробних тіл у 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

**Техніка виконання.** У стерильну пробірку Відаля вносили по 100 мкл гепаринізованої крові та активованої культури *Staphylococcus aureus*. Вміст ретельно перемішували і ставили у термостат при температурі +37°C на 1 годину. Перемішавши вміст пробірки, краплю його наносили на предметне скло і робили тонкий мазок, який потім висушували на повітрі, фіксували і фарбували по Романовському. По краю пофарбованого мазка рахували 100 нейтрофільних гранулоцитів під імерсійною системою (окуляр 10 або 15).

#### **2.4. Методика дослідження показників гуморального та неспецифічного імунітету. Визначення вмісту імуноглобулінів окремих класів у сироватці крові.**

Для оцінки функціонального стану В-системи імунітету в людини використовували визначення кількості трьох основних класів імуноглобулінів (M,G,A) у сироватці крові методом радіальної імунодифузії в агарі (по Манчині).

##### **Реактиви і матеріали:**

1. 1,5% агар (краще фірми «Діфко» або бактоагар) на мєдналовому буфері. Після повного розплавлення агар розфасовували у бактеріологічні пробірки по 8 мл і зберігали у холодильнику до використання;
2. Мєдналовий буфер: 9 мл мєдналу розчиняли у 0,5 л дистильованої води, додавали 65 мл 0,1н розчину хлористоводневої кислоти, об'єм доводять до 1л, рН 8,6.
3. Моноспецифічні антисироватки проти IgA, IgM, IgG людини.

**Техніка виконання.** Три пробірки з 1,5% агаром поміщали у киплячу водяну баню і тримали до повного розплавлення агару. Потім переносили на баню з температурою +50...+56 С. Антисироватки проти окремих класів

імуноглобулінів розводили дистильованою водою, переносили у бактеріологічні пробірки і також поміщали на водяну баню при температурі  $+50^{\circ}\dots +56^{\circ}\text{C}$  на 5хв. Після цього антисироватки змішували з агаром (співвідношення агару і розчину анти сироваток розраховували за титром останніх) і заливали між двома, злегка підігрітими, скляними пластинами (9x12), обмеженими рамкою з оргскла або іншого рівноцінного матеріалу у вигляді букви П.

Товщина рамки – 1мм, ширина стінок - 1см. Пластини залишали у вертикальному положенні до повного застигання агару. Потім знімали фіксуючі затиски й одну з пластин обережно виймали, одержуючи в такий спосіб на іншій пластині плато із шаром агару товщиною в 1 мм. В агарі круглим пробійником прорізали лунки діаметром 2 мм на відстані 2 см одна від одної. Агар з лунок відсмоктували, а лунки заповнювали стандартною сироваткою і сироватками хворих. У перші 3 лунки тонко відтягнутою пастерівською піпеткою або мікрошприцом вносили стандарт (не розведений, розведений у 2 і 4 рази) з відомою концентрацією імуноглобуліну, який варто визначити в сироватках. В інші лунки вносили досліджувані сироватки хворих. Лунки заповнювали сироватками до верхнього краю агару. Для визначення рівня IgA, IgG сироватки крові попередньо розводили у співвідношенні 1:3. Заповнені пластини поміщали у вологу камеру на строго горизонтальну площину і залишали при кімнатній температурі на 24 год. (для IgA, IgG) і 48 год. (для IgM).

Вимірявши діаметр кілець у стандартному препараті з відомим рівнем імуноглобуліну, будували калібровану криву на міліметровому папері. По горизонталі наносили концентрацію імуноглобулінів, по вертикалі - діаметр кілець преципітації. На підставі каліброваної кривої обчислювали концентрацію імуноглобулінів у випробуваній пробі. Якщо сироватку перед постановкою реакції розводили, то результати множили на величину, розведення.

Відповідно до Міжнародного стандарту сироваткових імуноглобулінів рівень їх у нормі складає: IgA - 3,4 г/л, IgM - 0,8 г/л, IgG - 7,58 г/л.

#### **Визначення вмісту імунних комплексів у сироватці крові.**

Існує ряд методів кількісного визначення циркулюючих імунних комплексів: радіоімунологічний, метод інгібування фагоцитозу агрегованого IgG перитонеальними макрофагами, тест на агрегацію тромбоцитів, реакція зв'язування комплементу та інші.

Порівняльні дослідження виявлення імунних комплексів у крові різними методами свідчать про те, що найбільш простим, але не уступає по інформативності іншим методам є метод преципітації в 3,75% розчині поліетиленгліколю.

Реактиви: Розчин №1 - 0,1 N боратний буфер з рН 8,4 (3,41 г борної кислоти, 4,275 г бури в 1 л дистильованої води); розчин №2 - 10 г «поліетиленгліколь 600» у 240 мл розчину №1.

**Техніка виконання.** У пробірку вносили 0,4 мл досліджуваної сироватки крові, додавали 0,8 мл розчину №1, ретельно перемішували по 0,4мл у 2 пробірки, в одну додавали 2,7 мл розчину №1 (контроль), в іншу – 2,7 мл розчину №2 (дослід).

Вміст пробірок перемішували і залишали на 60 хв. при кімнатній температурі. Після цього визначали оптичну щільність зразків за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 450 нм у кюветах №5. Вираховували різницю показників оптичної щільності, результат множили на 1000 і одержували кількість імунних комплексів у сироватці крові, виражену в умовних одиницях.

### **Методика оцінки фагоцитуючої здатності нейтрофільних гранулоцитів.**

В основі лежить здатність нейтрофілів крові поглинати і переварювати мікроби і характеризує їх функціональну активність.

**Реактиви:** ізотонічний розчин натрію хлориду (стерильний), суспензія убитих мікробів стафілокока (*Stafilococcus aureus* - штам 209).

Для приготування суспензії мікробів у пробірку або чашку Петрі з одноденною культурою стафілокока наливали невелику кількість ізотонічного розчину хлориду натрію, перемішували і розведену культуру піпеткою переносили у хімічну пробірку. Цю пробірку ставили на водяну баню та інактивували *Stafilococcus aureus* при температурі 90<sup>0</sup> С протягом 1 години. Потім вміст пробірки доводять до ступеня мутності бактеріального стандарту з концентрацією 1-5x10<sup>3</sup> мікробних тіл у 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

**Техніка виконання.** У стерильну пробірку Відаля вносили по 100 мкл гепаринізованої крові та інактивованої культури *Stafilococcus aureus*. Вміст ретельно перемішували і ставили у термостат при температурі +37<sup>0</sup> С на 1 годину. Перемішавши вміст пробірки, краплю його наносили на предметне скло і робили тонкий мазок, який потім висушували на повітрі, фіксували і фарбували по Романовському.

По краю пофарбованого мазка рахували 100 нейтрофільних гранулоцитів під імерсійною системою (окуляр 10 або 15). Визначали відсоток фагоцитуючих нейтрофільних гранулоцитів - показник фагоцитарної активності (ФА) і середню кількість мікробів, поглинених одним нейтрофілом - фагоцитарне число.

## **2.5. Статистична обробка результатів.**

Дані, отримані з проведених досліджень, оброблено загально-прийнятими методами варіаційної статистики з використанням критерію Ст'юдента.

Розрахунки проводились за допомогою ЕВМ і прикладного пакету статистичних програм «Stadia».



## Розділ III

### Експериментальна частина

#### 3.1. Дослідження впливу Доновіт-ВС на клітинний імунітет у жінок, хворих на рак яєчників.

В цьому розділі метою дослідження було вивчення нового українського препарату рослинного походження з онкопротекторною та імунозміцнюючою дією, що здатна впливати на показники клітинного імунітету, зокрема на CD3+ Т-лімфоцити, CD19+ В-лімфоцити, CD56+ НК-клітини, у 50 пацієток, які мали I, II та III стадії захворювання на РЯ.

Згідно проведеного лікування пацієнти були розподілені на групи, контрольну групу склали 8 практично здорових жінок, які виявили бажання добровільно обстежитись.

I група - практично здорові жінки;

II - група - це пацієтки, яким було проведено радикальну операцію + 3 курси хіміотерапії (циклофосфамід 750,0 мг/м<sup>2</sup>)

III - група - пацієтки, які отримували аналогічне лікування, але в схему протипухлинного комплексу включена імунотерапія Доновіт-ВС.

Доновіт-ВС рекомендовано за стандартною схемою в проміжках між курсами хіміотерапії. Було проведено 3 курси Доновіт-ВС.

Забір крові на імунологічне обстеження проводили перед першим курсом хіміотерапії і через 10 днів після останнього прийому Доновіт-ВС. Необхідно відмітити, що пацієткам другої групи призначили традиційні фармпрепарати та звичайна харчова дієта з включенням відварів вівса.

Як видно з даних, представлених в таблиці 3.1 у пацієток другої групи після проведеного комплексного лікування (3 курси ХТ) значно знижувалась CD3+ (Т-лімфоцитів), (53,5±0,6 і 43,1±0,5 відповідно). Включення в схему комплексного лікування препарату рослинного походження Доновіт-ВС забезпечило збереження кількості CD3+ лімфоцитів (51,8±0,6 і 59,9±0,4 відповідно).

Таблиця 3.1.

#### Кількість CD3+ (лімфоцитів) в крові пацієнтів хворих на РЯ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС

%	I група	II група		III група	
		До лікуванн	Після лікуванн	До лікуванн	Після лікування
	71,5 ±0,6	53,5 ±0,6	43,1 ±0,5	51,8 ±0,6	59,9 ± 0,4
n	8	10	10	20	20
p	—	<0,05			
P <sub>1</sub>					>0,05

В таблиці 3.2. представлені дані дослідження кількості CD19+ (В-лімфоцитів) в крові пацієток, хворих на РЯ. Отримані дані свідчать, що у пацієток другої групи в процесі комплексного протипухлинного лікування суттєво знижується і кількість CD19+ (В-лімфоцитів) ( $6,2 \pm 0,4$  і  $3,1 \pm 0,6$  відповідно).

Включення в схему комплексного протипухлинного лікування препарату рослинного походження Доновіт-ВС значно зменшує токсичну дію ХТ та збільшує кількість CD19+ (В-лімфоцитів) вище рівня до лікування ( $6,1 \pm 0,8$  і  $10,5 \pm 0,3$ ).

Таблиця 3.2.

**Кількість CD 19+ (лімфоцитів) в крові пацієнтів хворих на РЯ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС**

%	І група	ІІ група		ІІІ група	
		До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
	$12 \pm 0,8$	$6,2 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,6$	$6,1 \pm 0,8$	$10,5 \pm 0,3$
n	8	10	10	20	20
p				-	<0,05
P <sub>1</sub>	-				>0,05

В таблиці 3.3. представлені дані вивчення кількості CD56+ (НК- клітин) в крові пацієток хворих на рак яєчника до та після комплексного протипухлинного лікування з включенням імунотерапії новим українським препаратом рослинного походження Доновіт-ВС.

Як видно з даних, представлених в таблиці 3.3. після комплексного протипухлинного лікування в ІІ групі пацієток значно знижується і кількість лімфоцитів CD56+ (НК-клітин), які мають властивості природних кілерів пухлинних клітин.

Включення в схему комплексного протипухлинного лікування препарату рослинного походження підвищує кількість CD56+ лімфоцитів вище рівня до лікування (ІІІ група) ( $8,8 \pm 0,4$  і  $14,8 \pm 0,5$  відповідно).

**Кількість CD 56+ (НК-клітин) в крові пацієнтів, хворих на РЯ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС**

%	I група	II група		III група	
		До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
	21,2 ± 0,4	8,4 ± 0,8	6,3 ± 0,6	8,8 ± 0,4	14,8 ± 0,5
n	8	10	10	20	20
p		<0,05			
P <sub>1</sub>					>0,05

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що кількість лімфоцитів, а саме - CD3+, CD19+ та CD56+ зменшено порівняно із таким у практично здорових жінок. В процесі комплексного протипухлинного лікування у пацієток II групи спостерігалось подальше зменшення кількості T, B та НК лімфоцитів, і навпаки, у пацієток III групи в схему комплексного лікування яких було включено імунотерапію Доновіт-ВС, спостерігалось збереження кількості досліджуваних лімфоцитів (CD3+, CD19+ та CD56+) до значень перед лікуванням, що свідчить про захисну дію Доновіт-ВС.

**3.2. Дослідження впливу Доновіт-ВС на гуморальний імунітет у жінок, хворих на РЯ.**

В даному розділі наші дослідження були спрямовані на вивчення показників гуморального імунітету у пацієток, хворих на РЯ, схема комплексного протипухлинного лікування яких включала радикальну операцію + хіміотерапію (3 курси) – II група і аналогічно протипухлинного комплексу, але з включенням препарату рослинного походження, який має онкопротекторну та імуномодельюючу дію, Доновіт-ВС – III група.

В таблиці 3.4 представлені дані вивчення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у крові жінок, хворих на РЯ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС.

Як свідчать представлені в таблиці 3.4 дані до лікування в пацієток, хворих на РЯ в сироватці крові значно підвищена кількість ЦІК порівняно з показниками у практично здорових жінок (94,8 ± 0,6 і 50,5 ± 0,5 відповідно).

Після комплексного протипухлинного лікування у пацієток II групи кількість ЦІК в сироватці крові практично не змінюється, навіть відмічається тенденція до збільшення (94,8±0,6 і 98,5±0,4 відповідно до і після лікування).

Включення в схему комплексного лікування Доновіт-ВС значно зменшує кількість ЦК в сироватці крові у пацієток III групи після лікування ( $96,5 \pm 0,8$  і  $58,6 \pm 0,3$  відповідно).

Таблиця 3.4.

**Кількість ЦК в сироватці крові пацієнтів, хворих на рак яєчника до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС**

%	I група	II група		III група	
		До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
	$50,5 \pm 0,5$	$94,8 \pm 0,6$	$98,5 \pm 0,4$	$96,5 \pm 0,8$	$58,6 \pm 0,3$
n	8	10	10	20	20
p	—	<0,05			<0,05

В таблиці 3.5 представлені дані вивчення кількості імуноглобулінів 3-х класів IgA, IgM, IgG в крові жінок, хворих на РЯ до і після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС.

Як видно з даних представлених в таблиці 3.5, кількість імуноглобулінів класу А та М в I та II групах після лікування не змінювалась, тобто залишалась на рівні кількості практично здорових людей. Зміни відбувались тільки імуноглобуліну класу G, кількість якого у II групі пацієток після лікування зменшилась, а у III групі - збільшилась ( $10,0 \pm 0,3$  і  $7,0 \pm 0,5$  та  $9,8 \pm 0,5$  і  $11,8 \pm 0,2$  відповідно).

Таким чином, в результаті проведених досліджень показано, що вивчені показники гуморального імунітету у жінок, хворих на РЯ в процесі комплексного протипухлинного лікування, зокрема кількість ЦК та кількість імуноглобулінів 3-х класів IgA, IgM, IgG, відбулися наступні зміни, а саме кількість ЦК у пацієток II групи збільшувалась, включення в схему лікування Доновіт-ВС приводило до зниження кількості ЦК після лікування.

**Кількість імуноглобулінів 3-х класів Ig A, Ig M, Ig G в жінок, хворих на рак яєчника до і після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС.**

Таблиця 3.5.

%	I group			II group						III group					
				before treatment			after treatment			before treatment			after treatment		
	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG
	2.6 ± 0.2	1.30 ± 0.2	12.8 ± 0.2	2.85 ± 0.3	1.1 ± 0.4	10.0 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.4	7.0 ± 0.5	2.75 ± 0.4	1.2 ± 0.2	9.8 ± 0.5	3.01 ± 0.3	1.7 ± 0.4	11.8 ± 0.2
n	8	8	8	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20

**3.3. Вивчення впливу Доновіт-ВС на неспецифічний імунітет - фагоцитарну активність та фагоцитарний індекс у жінок, хворих на РЯ.**

В даному розділі метою наших досліджень було вивчення неспецифічної резистентності, а саме фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу у жінок, хворих на РЯ з включенням в схему комплексного лікування імунотерапії новим українським препаратом з імунозміцнюючою та протипухлинною дією - Доновіт-ВС.

В таблиці 3.6. представлені дані вивчення фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу і нейтрофілів в крові пацієнток, хворих на рак яєчників до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС.

Як свідчать дані представлені в таблиці 3.6. фагоцитарна активність та фагоцитарний індекс нейтрофілів у крові пацієнток II групи знижені порівняно з такими у практично здорових людей ( $71,5 \pm 0,5$  і  $60,2 \pm 0,4$  та  $61,1 \pm 0,4$  відповідно).

В процесі комплексного лікування відбувалось значне зниження ФА та ФІ з показниками до лікування ( $60,2 \pm 0,4$  і  $42,5 \pm 0,3$  відповідно ФА та  $4,6 \pm 0,3$  і  $2,5 \pm 0,5$  відповідно ФІ).

Включення в схему комплексного протипухлинного лікування Доновіт-ВС підвищує у III групі пацієнток показники фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу майже до рівня практично здорових людей ( $71,5 \pm 0,5$  і  $7,5 \pm 0,2$  - I група,  $68,8 \pm 0,6$  і  $5,6 \pm 0,4$  - III група відповідно).

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що проведене комплексне протипухлинне лікування (радикальне оперативне втручання + хіміотерапія) значно знижує показники фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу. Включення в схему комплексного лікування 3-х курсів лікування Доновіт-ВС суттєво покращує показники фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу, що в подальшому впливає на перебіг пухлинного процесу у жінок, хворих на РЯ.

Фагоцитарна активність та фагоцитарний індекс нейтрофілів в крові пацієнтів, хворих на рак яєчників до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС.

Таблиця 3.6.

%	I група		II група				III група			
			до лікування		Після лікування		до лікування		після лікування	
	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ
	71,5 ± 0,5	7,5 ± 0,2	60,2 ± 0,4	4,6 ± 0,3	42,5 ± 0,3	2,5 ± 0,5	61,1 ± 0,4	4,5 ± 0,5	68,8 ± 0,6	5,6 ± 0,4
n	8	8	10	10	10	10	20	20	20	20
p			<0,05							
p1			-		>0,05					
p2							-		<0,05	
p3										>0,05

## Дослідження впливу Доновіт-ВС на клітинний, гуморальний та неспецифічний імунітет у хворих на рак молочної залози

Мета дослідження – вивчення впливу нового українського препарату рослинного походження з онкопротекторною та імунозміцнюючою дією – Доновіт-ВС на показники клітинного, гуморального та неспецифічного імунітету зокрема – CD3 + (Т-лімфоцити), CD19 + (В-лімфоцити), CD56 + (НК-клітини), ЦК, фагоцитарну активність та фагоцитарний індекс у 25 пацієток, які мали II, III та IV стадії захворювання на рак молочної залози (РМЗ).

Дослідження проведені на базі лабораторії імунології та денного стаціонару Київської міської онкологічної лікарні (КМОЛ). Матеріалами дослідження були результати імунологічного обстеження 25 пацієток, хворих на рак молочної залози, які лікувались протягом 2007-2009 років в денному стаціонарі КМОЛ. Контрольну групу склали 10 практично здорових жінок, які добровільно обстежувались на імунологічний статус в лабораторії імунології. Середній вік контрольної групи склав –  $40,5 \pm 2,5$  років. Середній вік пацієток  $59,5 \pm 5,3$  років.

Таблиця 1

Методи дослідження та кількість обстежених хворих

Методи дослідження	Кількість жінок
Загальноклінічний	25
Гістологічний	25
Імунологічний	35
Цитофлюорометричний	35
Статистичний	35

Крім комплексного обстеження хворих на РМЗ було проведено комплексне лікування (згідно міжнародних стандартів), яке включало радикальне оперативне втручання з наступними хіміо- та променевим лікуванням. Частині хворих проводили аналогічне лікування з включенням імуноотрени новим українським препаратом з протипухлинною та імунозміцнюючою дією – Доновіт-ВС.

Згідно проведеного лікування пацієтки були розподілені на групи:

I група – практично здорові жінки;

II група – це пацієтки, яким було проведено радикальну операцію + 3 курси полі хіміотерапії (циклофосфан 200 мг, митокоатрон 10 мг/м<sup>2</sup>, фторураціл 400 мг/м<sup>2</sup>, вінкрістин 1,4 мг/м<sup>2</sup>);

III група – пацієтки, які отримували аналогічне лікування, але в схему протипухлинного комплексу включена імуноотерапія Доновіт-ВС.

Доновіт-ВС рекомендовано за стандартною схемою в проміжках між

курсами хіміотерапії. Було проведено 3 курси з Доновіт-ВС.

Забір крові на імунологічне обстеження проводили перед першим курсом хіміотерапії і через 10 днів після останнього прийому Доновіт-ВС. Необхідно відмітити, що пацієнткам другої групи призначали традиційні фармпрепарати та звичайна харчова дієта з включенням відварів вівса.

Як видно з даних, представлених в таблиці 2 у пацієток другої групи після проведеного комплексного лікування (3 курси поліхіміотерапії) значно знижувалась кількість CD3<sup>+</sup> лімфоцитів (55,4±0,6 і 46,1±0,4, p<0,05 відповідно). Включення в схему комплексного препарату рослинного походження Доновіт-ВС привело до збільшення кількості CD3<sup>+</sup> після лікування (53,9±0,3 і 60,1±0,4, p<0,05).

Таблиця 2

Кількість CD3 + лімфоцитів в крові жінок, хворих на РМЗ після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС

	I група	II група		III група	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
%	68,5±0,8	55,4±0,6	46,1±0,4	53,9±0,3	60,1±0,4
n	10	10	10	15	15
p		-	<0,05		
p <sub>1</sub>				-	<0,05

Таблиця 3

Кількість CD19 + лімфоцитів в крові жінок, хворих на РМЗ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС

	I група	II група		III група	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
%	11,8±0,6	6,5±0,5	4,1±0,4	6,2±0,4	9,1±0,5
n	10	10	10	15	15
p		-	<0,05		
p <sub>1</sub>				-	<0,05

В таблиці 3 представлені дані дослідження кількості CD19 + лімфоцитів в крові пацієток, хворих на РМЗ. Отримані дані свідчать, що у пацієток II групи в процесі комплексного протипухлинного лікування суттєво знижується і кількість CD19 + лімфоцитів (6,5±0,5 і 4,1±0,4 відповідно).

Включення в схему комплексного протипухлинного лікування



препарату рослинного походження Доновіт-ВС значно зменшує токсичну дію хіміотерапії та збільшує кількість CD19 + лімфоцитів ( $6,2 \pm 0,4$  і  $9,5 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ).

Таблиця 4

Кількість CD56 + (НК-клітин) в крові жінок, хворих на РМЗ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС

	I група	II група		III група	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
%	$22,4 \pm 0,6$	$9,2 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,8$	$15,1 \pm 0,6$
n	10	10	10	15	15
p	-	$<0,05$			
p <sub>1</sub>				-	$<0,05$

Представлені в таблиці 4 дані свідчать про те, що після комплексного протипухлинного лікування в пацієток II групи суттєво знижується і кількість CD56 + лімфоцитів, які мають властивості природних кілерів пухлинних клітин.

Включення в схему комплексного протипухлинного лікування препарату рослинного походження Доновіт-ВС значно підвищує кількість CD56 + лімфоцитів ( $8,6 \pm 0,8$  і  $15,1 \pm 0,6$  відповідно до і після лікування, III група пацієнтів).

В таблиці 5 представлені дані визначення циркулюючих імунних комплексів крові жінок, хворих на РМЗ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС.

Як свідчать представлені в таблиці 5 дані, кількість ЦІК в пацієток, хворих на РМЗ збільшується в порівнянні з аналогічним показником у практично здорових жінок ( $80,5 \pm 0,8$ ;  $83,6 \pm 0,5$  і  $50,8 \pm 0,4$  відповідно).

Таблиця 5

Кількість ЦІК в сироватці крові пацієнтів хворих на РМЗ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС

	I група	II група		III група	
		до лікування	після лікування	До лікування	після лікування
%	$50,8 \pm 0,4$	$80,5 \pm 0,8$	$82,4 \pm 0,6$	$82,6 \pm 0,5$	$60,8 \pm 0,6$
n	10	10	10	15	15
p	-	$<0,05$			
p <sub>1</sub>					$<0,05$

Після комплексного протипухлинного лікування у пацієток II групи кількість ЦК в сироватці крові практично не змінюється ( $80,5 \pm 0,8$ ;  $82,4 \pm 0,6$  відповідно до і після лікування).

Включення в схему комплексного лікування Доновіт-ВС значно зменшує кількість ЦК в сироватці крові у пацієток III групи після лікування ( $82,6 \pm 0,5$  і  $60,8 \pm 0,6$ ,  $p < 0,05$  відповідно).

В таблиці №6 представлені дані вивчення фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу нейтрофілів в крові пацієток хворих на РМЗ.

Як свідчать дані, представлені в таблиці 6, ФА та ФІ нейтрофілів в крові пацієток II групи знижені порівняно з такими у практично здорових людей ( $62,2 \pm 0,4$ ;  $61,4 \pm 0,6$  і  $74,5 \pm 0,6$  відповідно).

Таблиця 6

Фагоцитарна активність та фагоцитарний індекс нейтрофілів в крові жінок, хворих на РМЗ до та після комплексного лікування з включенням імунотерапії Доновіт-ВС

	I група		II група				III група			
			до лікування		після лікування		до лікування		після лікування	
	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ
	$74,5 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,4$	$62,2 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,3$	$56,5 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,6$	$61,4 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,6$	$68,4 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,3$
n	10	10	10	10	10	10	15	15	15	15
p	-		$<0,05$							
p <sub>1</sub>			-		$<0,05$					
p <sub>2</sub>							-		$>0,05$	
p <sub>3</sub>										$>0,05$

В процесі комплексного лікування відбулось суттєве зниження ФА та ФІ порівняно з показниками до лікування (ФА –  $62,2 \pm 0,4$  і  $56,5 \pm 0,5$ ,  $p < 0,5$ ; ФІ –  $4,5 \pm 0,3$  і  $3,1 \pm 0,6$ ).

Доновіт-ВС, включений в схему комплексного лікування жінок, хворих на РМЗ (III група) підвищував показник ФА та ФІ (ФА –  $61,4 \pm 0,6$  і  $68,4 \pm 0,6$ ; ФІ –  $4,6 \pm 0,6$  і  $5,9 \pm 0,3$  відповідно до та після лікування).

Таким чином, в результаті проведених досліджень вперше встановлено, що включення в схему комплексного лікування жінок, хворих на РМЗ нового українського препарату Доновіт-ВС приводить до суттєвого відновлення вивчених показників клітинного, гуморального та неспецифічного імунітету, а саме CD3+, CD19+, CD56+, ЦК, ФА та ФІ.

Окрім того, у пацієток які приймали Доновіт-ВС, суб'єктивно покращувалось самопочуття і краще переносилась наступна поліхіміотерапія.

**Отримані дані дозволяють рекомендувати Доновіт-ВС для включення в схеми протипухлинного лікування, як препарат який володіє захисною дією на імункомпетентні клітини та покращує самопочуття пацієток хворих на РМЗ.**

## Висновки

В результаті проведених досліджень встановлено, що проведене комплексне протипухлинне лікування (радикальне оперативне втручання + хіміотерапія) значно знижує показники фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу. Включення в схему комплексного лікування 3-х курсів лікування Доновітом-ВС суттєво покращує показники фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу, що в подальшому впливає на перебіг пухлинного процесу у жінок, хворих на рак яєчників.

Отримані дані у хворих на рак молочної залози дозволяють рекомендувати Доновіт-ВС для включення в схеми протипухлинного лікування, як препарат який володіє захисною дією на імунокомпетентні клітини, покращує самопочуття пацієток та дозволяє краще переносити поліхіміотерапію.

Завідувач імунологічною  
лабораторією, к.б.н.,  
лікар-лаборант-імунолог  
вищої категорії



Черненко О.Д.