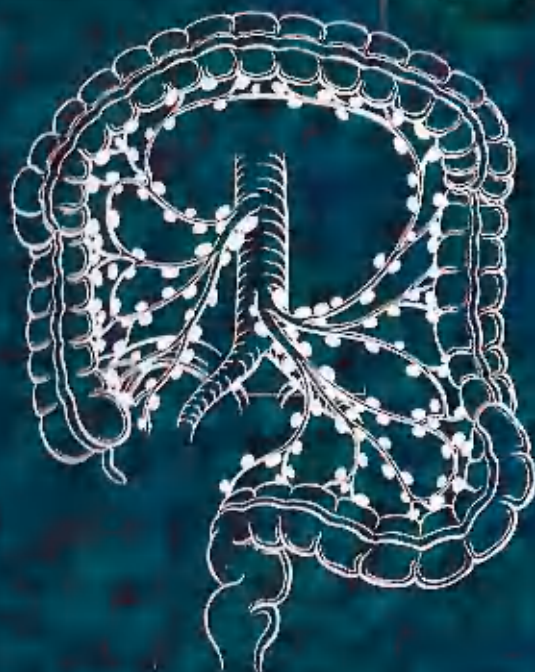


Под редакцией В.Ю. Сельчука,
М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского

Под редакцией В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского

ОПУХОЛЕВЫЕ СЕРОЗИТЫ

плевриты,
асциты,
перикардиты



практическая медицина

Глава 11. Иммуноterapia опухолевых серозитов

*К. С. Титов, И. Ж. Шубина, С. М. Волков, Л. В. Демидов,
И. Н. Михайлова, М. В. Киселевский*

Развитие опухоли находится под контролем различных субпопуляций лимфоцитов, при этом ведущая роль принадлежит НК, способным распознавать и лизировать злокачественно трансформированные клетки. Тем не менее опухолевые клетки могут «ускользнуть» от иммунобиологического надзора и активно пролиферировать. Недостаточная эффективность иммунной системы при злокачественных новообразованиях обусловлена не только особенностями опухолевых клеток (отсутствие специфических антигенов, быстрое деление и т.п.) и их устойчивостью к цитотоксическому действию эффекторов противоопухолевого иммунитета, но также низким уровнем активации цитотоксических лимфоцитов и плохой биодоступностью опухоли. Кроме того, опухолевые клетки секретируют супрессорные факторы, угнетающие киллерную активность и пролиферацию лимфоцитов [1].

Для повышения эффективности системы противоопухолевого иммунитета используют различные иммуномодуляторы и активированные иммунокомпетентные клетки.

В результате длительных исследований, начатых в 1965 г., был обнаружен фактор, ответственный за пролиферацию и активацию лимфоцитов, — ИЛ-2. В экспериментальных условиях было показано, что ИЛ-2 повышает цитотоксичность НК против опухолевых клеток, в том числе и резистентных к действию нестимулированных лимфоцитов.

Первые упоминания о цитокиновой терапии, примененной в монорежиме, относятся к 1980-м гг. В 1983 г. Bindon и соавт. применили ИЛ-2 для лечения больных с меланомой; клинические эффекты были обнаружены при введении ИЛ-2 в дозе 100 000 МЕ/кг в течение 4–5 сут. Введение в организм больных ИЛ-2 приводило к активации эндогенных НК и стимуляции их киллерной активности по отношению к опухолевым клеткам, однако высокодозная цитокиновая терапия сопровождалась выраженными побочными явлениями, которые превосходили по своей значимости клинические эффекты. ИЛ-2 применялся также для индукции НК при различных гематологических заболеваниях в качестве адъювантного средства при химиотерапии [2].

Rosenberg и соавт. [3, 4] были проведены клинические испытания ИЛ-2 в сочетании с ЛАК. ЛАК-клетки, основным действующим началом которых были НК, получали из лимфоцитов крови больных при инкубации с ИЛ-2 в экстракорпоральных условиях. Этот вид иммунотерапии, получивший название адоптивной, применялся главным образом для лечения так называемых иммуночувствительных форм злокачественных новообразований — меланомы и рака почки. В последние годы появились сведения о применении ИЛ-2/ЛАК-терапии при различных локализациях злокачественных новообразований. Наибольшие клинические эффекты были получены при локальных и локорегиональных введениях ИЛ-2 и ЛАК, в частности при лечении опухолевых серозитов.

11.1. Внутриполостная иммунотерапия злокачественных плевритов

В ряде клинических исследований было показано, что внутриполостное введение иммуномодуляторов, таких как рекомбинантные аналоги секретируемых иммунокомпетентными клетками цитокинов (ИЛ и ИФН) и дериватов бактериальных клеток, вызывает регрессию злокачественных выпотов. Локорегиональное введение цитокинов, в частности ИЛ-2, по сравнению с системной терапией позволяет поддерживать высокий локальный уровень цитокина, создавая благоприятные условия для ИЛ-2-зависимой активации внутривлевроальных мононуклеарных лейкоцитов.

При внутривлепуральном введении ИЛ-2 обладает дозозависимой токсичностью, при этом максимально переносимая доза ИЛ-2 составила 36×10^6 МЕ. Основными и наиболее частыми побочными эффектами были лихорадка и гриппоподобный синдром. В ряде случаев отмечалась эозинофилия и транзиторное увеличение плеврального выпота. Однако серьезные побочные эффекты у пациентов не выявлялись. У больных с мезотелиомой плевры внутривлепуральная ИЛ-2-терапия приводила к частичной регрессии в 19% и стабилизации заболевания — в 33% случаев [5, 6]. У больных немелкоклеточным раком легкого, осложненным плевритом, внутривлепуральное введение ИЛ-2 в дозе 9×10^6 МЕ приводило к полной или частичной регрессии злокачественного выпота у 62% больных [7].

В клинических исследованиях было показано, что более высокой эффективностью по сравнению с внутривлепуральной ИЛ-2-терапией обладает комбинация ИЛ-2 с аутологичными ЛАК. ЛАК получали при активации ИЛ-2 лимфоцитов, выделенных из злокачественного выпота у пациентов с мезотелиомой плевры, раком легкого, молочной железы и яичников [8–10]. Исходно в злокачественном экссудате содержится небольшое количество НК с низкой цитолитической активностью [11, 12]. Несмотря на это ЛАК, генерированные из лимфоцитов злокачественных выпотов, обладали высокой киллерной активностью. Внутривлепуральное введение ЛАК и ИЛ-2 продемонстрировало высокую эффективность и хорошую переносимость, при этом в наиболее крупном исследовании суммарный ответ на внутривлепуральную иммунотерапию составил 94,5% [8].

Проведенное в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН клиническое исследование эффективности внутривлепуральной ИЛ-2/ЛАК-терапии включало 85 больных со злокачественными выпотами: рак легкого — 31 (37%), молочной железы — 26 (30,0%), мезотелиома плевры — 6 (7%) и другие локализации — 22 (26,0%); 36 (42%) мужчин и 49 (58%) женщин (рис. 11.1).

Состояние больных расценивалось как средней тяжести у 68 (80%) и тяжелое у 25 (20%). До начала ИЛ-2/ЛАК-терапии 48 (56%) больным со злокачественными выпотами проводилась лучевая и химиотерапия, в том числе с внутривлепуральным введением цитостатиков, без клинического эффекта.

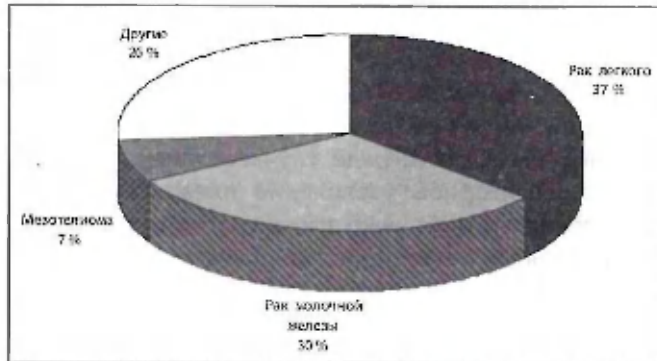


Рис. 11.1. Распределение больных с опухолевыми плевритами

Перед началом иммунотерапии из плевральной полости удалялось от 500 до 2800 мл серозного или серозно-геморрагического экссудата. Во всех случаях проводилось цитологическое исследование плеврального выпота: плоскоклеточный рак – 5 (6%) больных, аденокарцинома – 29 (34%), мезотелиома – 6 (7%), рак без дополнительных уточнений – 40 (47%), у 5 (6,0%) больных опухолевые клетки в экссудате не обнаружены. Диагноз мезотелиомы плевры подтвержден иммуноморфологическими исследованиями.

Диагноз метастатического плеврита был установлен клинически, рентгенологически во всех наблюдениях, кроме 5, в экссудате были выявлены опухолевые клетки.

Степень экссудации у пациентов варьировала от слабой до выраженной. В большинстве случаев отмечалась умеренная степень накопления плеврального выпота (0,5–1,5 л/сут).

Чаще всего наблюдался односторонний плеврит (с одинаковой частотой справа и слева). В 7,7% случаях отмечено двустороннее накопление жидкости, у этих пациентов вначале дренировалась одна плевральная полость, а после достижения клинического эффекта – вторая.

11.1.1. Методика внутривнутриплевральной иммунотерапии

Для проведения ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии плевральная полость дренировалась катетером в течение 2–4 нед. под местной анестезией. В большинстве случаев плевраль-

ную пункцию проводили по лопаточной и заднеподмышечной линии. На основании рентгенологических исследований пункции проводились в оптимальных точках скопления плеврального выпота. Для дренирования плевральной полости использовали набор «Плеврокан» (США), кроме того, применяли подключичный катетер, соединенный со стерильными емкостями с гепарином (20 ед./мл), в которые эвакуировался экссудат. Плевральная полость ежедневно осушалась перед введением препарата. На цитологическое исследование экссудат отправляли до проведения иммунотерапии и в конце каждой недели курса. Контрольное рентгенологическое исследование проводили после прекращения или уменьшения экссудации или через 4 нед. в случае отсутствия эффекта. При обнаружении осумкованной жидкости проводили дополнительную пункцию, и после удаления жидкости в плевральную полость вводили препарат.

Полученный экссудат центрифугированием (1000 об./мин в течение 20 мин) разделялся на клеточную и плазменную часть. Плазменная часть в тех случаях, когда проводилась ее реинфузия, дополнительно центрифугировалась при 6000 об./мин в течение 30 мин для элиминации клеточных фрагментов и затем, после цитологического контроля, бактериологического и биохимического исследований, возвращалась больному внутривенно.

Из клеточной фракции выделялись мононуклеарные лейкоциты и опухолевые клетки в двухступенчатом градиенте плотности Ficoll-Hystopaque (Sigma, США). Из мононуклеарных лейкоцитов генерировали ЛАК, опухолевые клетки использовались для оценки цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов и ЛАК.

Для получения ЛАК мононуклеарные лейкоциты помещались в культуральные пластиковые флаконы в питательной среде RPMI1640 с глютамином и гентамицином (рис. 11.2).

Исходная концентрация мононуклеарных лейкоцитов составляла 2 млн/мл. В питательную среду добавляли ИЛ-2 (Ронколейкин, Биотех, Россия) в концентрации 1000 МЕ/мл. Мононуклеарные лейкоциты инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5% CO₂ в течение 48 ч. По окончании инкубации полученные ЛАК дважды отмывали от среды и ресуспендировали в 20 мл физиологического раствора. До и после активации клетки подвергались цитологическому исследованию.



Рис. 11.2. Схема получения лимфокин-активированных киллерных клеток

Иммунотерапия опухолевых серозитов

Аллогенные ЛАК генерировали из мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из периферической крови здоровых доноров.

Все больные получили 1–3 курса ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии. Каждый курс состоял из 5 внутривлепуральных инъекций Ронколейкина (ИЛ-2) в дозе 0,5–1,0 млн МЕ и 5 инъекций ЛАК по 50–100 млн клеток. Курс лечения продолжался 2 нед.

Эффективность лечения оценивалась по срокам накопления экссудата и по изменению его клеточного состава (уменьшению числа опухолевых и увеличению числа лимфоидных клеток). За полный эффект принималось отсутствие плеврального выпота в течение месяца. Частичный эффект соответствовал незначительному накоплению жидкости в отграниченных полостях, которое не требовало ее удаления.

11.1.2. Механизм действия интерлейкина-2 и лимфокин-активированных киллеров

И. О. Чикилева, Л. М. Родионова, О. В. Лебединская,
Н. Ю. Анисимова

Эффективность ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии связывается с активацией лимфоцитов и, прежде всего, НК, способных распознавать и лизировать опухолевые клетки. Внутривлепуральное введение ИЛ-2 и добавление этого цитокина к мононуклеарным лейкоцитам *in vitro* приводит к пролиферации лимфоцитов и повышению их противоопухолевой цитотоксичности.

Цитотоксическая активность и иммунофенотип лимфокин-активированных киллеров

Мононуклеарные лейкоциты, выделенные из плеврального экссудата больных, обладали естественной (спонтанной) киллерной активностью в отношении аутологичных опухолевых клеток. Однако их цитотоксичность составляет всего $10,0 \pm 4,0\%$ и явно недостаточна для достижения эффекта. Полученные из мононуклеарных лейкоцитов в результате экстракорпоральной активации ЛАК характеризовались значительно большей активностью ($p < 0,05$). Цитотоксичность ЛАК составила $55,0 \pm 6,0\%$. Таким образом, активация мононуклеарных лейкоцитов экссудата ИЛ-2 (Ронколейкином) приводила к генерации ЛАК, способных эффективно лизировать собственные опухолевые клетки.

Имунофенотип лимфоцитов, выделенных из плеврального экссудата в процессе лечения Ронколейкином (после 5–7 внутривлебральных введений), характеризуется повышенной экспрессией активационных антигенов (CD25, HLA-DR), молекул адгезии (CD58), а также антигенов НК (CD16, CD56) по сравнению с лимфоцитами, полученными из злокачественного выпота до иммунотерапии (табл. 11.1).

Таблица 11.1. Иммунофенотип лимфоцитов плеврального экссудата на фоне внутривлебральной иммунотерапии Ронколейкином (ИЛ-2)

| Статус лечения | Дифференцировочные антигены лимфоцитов | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--|-----------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|--|--|
| | CD3 | CD8 | CD4 | CD25 | CD16 | CD56 | CD58 | HLA-DR | | |
| До начала иммунотерапии | 63,7 ± 6,4 | 5,9 ± 1,4 | 18,9 ± 2,3 | 4,5 ± 0,5 | 4,8 ± 1,4 | 6,3 ± 3,5 | 40,3 ± 3,5 | 4,7 ± 1,4 | | |
| В конце курса иммунотерапии | 71,1 ± 5,2 | 6,6 ± 2,1 | 21,8 ± 4,2 | 11,6 ± 1,7 | 12,7 ± 2,3* | 17,9 ± 4,2* | 56,5 ± 3,4 | 28,8 ± 3,7* | | |

* Достоверные изменения при $p < 0,05$.

Иммунотерапия опухолевых серозитов

Цитологическое исследование

При цитологическом исследовании установлено, что в плевральном выпоте до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток. Также определялись клетки мезотелия, гистиоидные клетки, макрофаги, нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты. Лимфоидные элементы были представлены преимущественно зрелыми лимфоцитами. В цитограмме экссудатов плоскоклеточного рака по сравнению с железистым отмечался более выраженный воспалительный компонент с признаками клеточного распада. В процессе лечения обращала на себя внимание адгезия лимфоцитов к опухолевым клеткам (как начальный визуализируемый этап их последующего лизиса в результате противоопухолевого эффекта ЛАК). После 1–2 нед. лечения в экссудате определялись лишь единичные опухолевые клетки с явлениями дегенерации, и напротив, значительно увеличивалось число лимфоцитов (рис. 11.3, см. цв. вклейку).

Мониторинг экстракорпоральной генерации ЛАК показал, что при активации ИЛ-2 мононуклеарных лейкоцитов экссудата на 3-и сутки происходила пролиферация лимфоцитов, появлялись лимфоидные элементы различной степени зрелости, регистрировались единичные митозы. На 5-е сутки возрастало число крупных активированных лимфоцитов, типа пролимфоцитов, появлялись клетки типа иммунобластов, повышалось количество митозов. Подобные изменения расценены как реакция бласт-трансформации, подтверждающая активацию лимфоидных клеток (рис. 11.4, см. цв. вклейку).

11.1.3. Эффективность внутривнутриплеврального введения интерлейкина-2 и аутологичных лимфокин-активированных киллеров при опухолевых плевритах

При внутривнутриплевральном введении Ронколейкина и аутологичных ЛАК, генерированных из лимфоцитов плеврального выпота, клиническая эффективность составила 88%, при этом у 60 пациентов удалось достичь полной, а у 10 – частичной регрессии экссудата. Возобновление экссудации у 10 (11,8%) пациентов отмечалось через 1,2–2,5 мес. после окон-

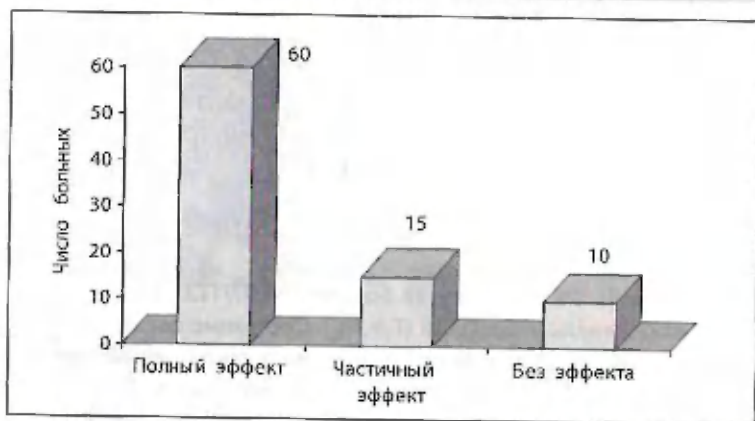


Рис. 11.5. Распределение больных по эффекту внутривнутриплевральной иммунотерапии Роклейкином (ИЛ-2) и аутологичными лимфокин-активированными киллерами

чания лечения, однако повторное проведение 1–2 курсов ИЛ-2/ЛАК-терапии приводило к регрессии злокачественного выпота. Следует отметить, что замедление или прекращение экссудации наступало только в тех случаях, когда в плевральном выпоте отмечалось значительное количество активированных лимфоидных клеток с наличием иммунобластов и митозов.

Восьми больным было проведено повторно несколько курсов лечения по поводу осумкованного плеврального экссудата. Второй курс проводился через месяц путем внутривнутриплевральных введений ИЛ-2 в мелкие (до 150 мл) остаточные полости под рентгенографическим контролем (рис. 11.5), во всех случаях отмечен клинический эффект.

Уменьшение и прекращение экссудации подтверждалось рентгенологически. В отдельных наблюдениях иммунологический плевродез сопровождался также снижением показателей опухолевых маркеров, уменьшением размеров и плотности метастатически измененных надключичных лимфатических узлов. Устранение плеврита позволяло перейти к решению тех лечебных задач, которые имелись до выявления плеврального экссудата: в одном случае успешно проведена лучевая и в 15 — химиотерапия по поводу немелкоклеточного рака легкого, в остальных — осуществлялось динамическое наблюдение. Его срок составлял от 2 мес. до 2 лет. Течение

заболевания в этом временном интервале характеризовались иными проявлениями опухолевого процесса, в том числе прогрессированием, однако без признаков ОП.

Распределение больных по эффекту внутрисплевральной иммунотерапии представлено на рис. 11.5.

Наблюдение 1

Больная К., 39 лет, история болезни № 97/12254, рак правой молочной железы, стадия IIIB ($T_3N_1M_0$). Состояние после комплексного лечения (1995 г.). Правосторонний экссудативный плеврит. Состояние после внутрисплевральной иммунотерапии.

Заболевание проявилось в феврале 2000 г. нарастающей слабостью, кашлем, одышкой. 14 октября 1995 г. проведена лучевая терапия на молочную железу СОД 44 Гр и зоны регионарного метастазирования (парастернальную, надключичную, подключичную) СОД 40 Гр. 5 сентября 1995 г. выполнена радикальная мастэктомия справа. Проведено 5 курсов полихимиотерапии по схеме FAC.

В январе 1999 г. выявлен правосторонний метастатический плеврит и проведена внутрисплевральная химиотерапия с 5-фторурацилом с частичным эффектом. В марте 2000 г. при обследовании подтвержден метастатический плеврит. Проведен повторный курс внутрисплевральной химиотерапии по той схеме, от которой эффекта не было. В апреле эвакуация экссудата (700–800 мл серозной жидкости ежедневно) с введением в плевральную полость 1 млн МЕ Ронколейкина (суммарная доза 12 млн МЕ) и двукратно ЛАК по 100 тыс. клеток. Состояние оставалось удовлетворительным, лечение без побочных эффектов. Отмечено осушение плевральной полости. На контрольных рентгенограммах через 2 мес. жидкости и признаков воспаления не выявлено.

Наблюдение 2

Больная О., 49 лет, история болезни № 99/13370, мезотелиома плевры слева. Левосторонний плеврит. Состояние после химиоиммунотерапии (химиотерапии, внутрисплевральной иммунотерапии), пневмонэктомии (08.02.2000).

Заболевание проявилось в июне 1999 г. одышкой и недомоганием. Выявлен плеврит слева, удалено 2300 мл экссудата. С 5-го по 16 октября 1999 г. проведена системная химиотерапия (ци-

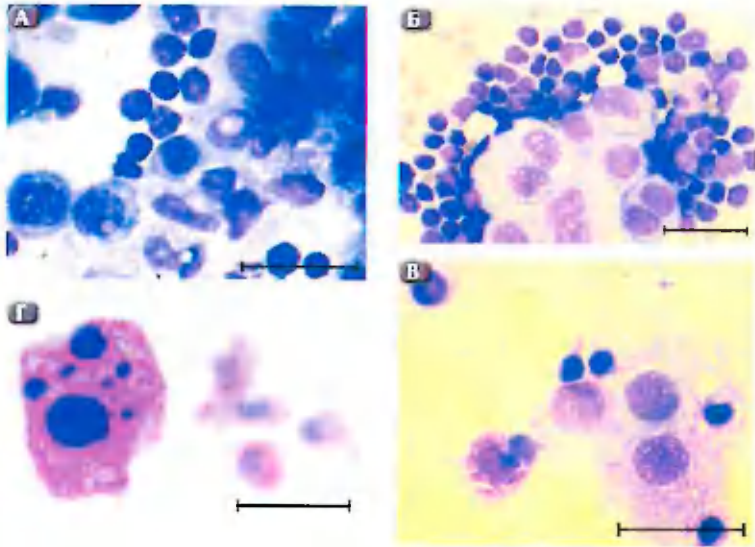


Рис. 11.3. Цитологическая картина экссудата у больной раком молочной железы на фоне внутриплевральной ИЛ-2/ЛАК-терапии. *А.* До лечения. В экссудате определяется большое количество опухолевых клеток и несколько зрелых лимфоцитов. *Б.* Через неделю после ИЛ-2/ЛАК-терапии. В экссудате опухолевые клетки в состоянии деградации окружены ЛАК. *В.* Окончание лечения. В остаточных количествах экссудата отсутствуют опухолевые клетки, видны лимфоциты и гистиоидные клетки; окраска гематоксилин-эозином. *Г.* Окончание лечения. Опухолевые клетки в состоянии апоптоза; окраска по Браше, $\times 900$.

Иммунотерапия опухолевых серозитов

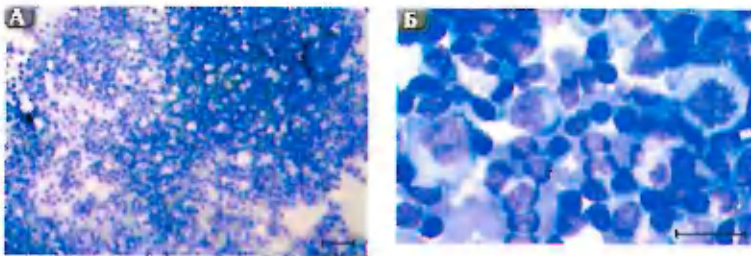


Рис. 11.4. Лимфокин-активированные киллеры, полученные из лимфоцитов плеврального выпота. В культуре присутствуют крупные лимфоидные элементы с широкой цитоплазмой, видны митозы. *А.* $\times 200$. *Б.* $\times 900$.

клофосфан 1000 мг, винкристин 3 мг, 5-фторурацил 750 мг, метотрексат 40 мг). В августе удалено 1700 мл экссудата, с 3-го по 10 августа 1999 г. проведена внутривидеальная химиотерапия (циклофосфан 900 мг, адриамицин 50 мг, платинол 50 мг). Сохранялась одышка.

При пункции плевральной полости (20.08.1999) удалено 2000 мл серозно-геморрагического экссудата. Цитологические исследования выявили в первых исследованиях опухолевые клетки, в последующем элементы опухоли не определялись.

При обследовании, в том числе по результатам рентгеномографии и КТ грудной клетки, бронхоскопии, маммографии, скенирования щитовидной железы, гастроскопии (июль 1999 г.), колоноскопии, УЗИ и КТ брюшной полости и малого таза, исследования маркеров (СА-125 = 16,9 МЕ/мл), онкологических заболеваний не выявлено, кроме ОП. При рентгенографии слева в плевральной полости определяется жидкость до VII ребра со смещением средостения вправо. После удаления экссудата проведен 1 курс внутривидеальной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии. Отмечено прекращение экссудации. При повторном поступлении (через 3 мес.) из плевральной полости извлекалось незначительное количество серозного экссудата. Проведен 2-й курс иммунотерапии внутривидеальными введениями препарата Ронколейкин.

При третьем поступлении отмечает боли в груди слева, определяется умеренная деформация грудной клетки за счет уменьшения ее левой половины. Экссудата из плевральной полости не получено. По данным КТ грудной клетки определяется утолщенная плевра слева, в особенности в нижних отделах, множественные узлы на ней, сдавление и деформация нижней доли. Под КТ-контролем сделана биопсия двух узлов на плевре. Материал гистологического, а также цитологического исследования не позволял исключить мезотелиому, а также метастатическое поражение из молочной железы и яичников. Дополнительное обследование, включая лапароскопию, не выявило проявлений опухоли.

Больная оперирована в объеме паллиативной пневмонэктомии слева с резекцией перикарда на участке 6 × 8 см и пластикой сеткой «Гортекс». Паллиативный характер вмешательства был обусловлен оставлением части ткани фиброзной плотности на диафрагме и аорте из-за технической невозможности удаления. Гистологическое исследование: злокачественная мезотелиома с распространением комплексов опухоли по лимфатическим щелям в прилежащую ткань легкого, метастазами в удаленных лимфоузлах.

Внутриплеврально продолжено введение аллогенных ЛАК-клеток. В дальнейшем выявлены метастазы в шейно-надключичной зоне слева и в области левой боковой поверхности грудной клетки, опухолевый перикардит. При пункции удален экссудат (цитология: клетки злокачественного новообразования); проведен курс внутривенной иммунотерапии Ронколейкином и химиотерапия по схеме: гемзар 1800 мг в 1, 14, 28-й дни, 5-фторурацил 2000 мг во 2, 9, 15, 21 и 29-й дни, лейковорин 40 мг во 2, 9, 15, 21, 29-й дни. В интервалах между химиотерапией внутривенно введены ЛАК из аллогенных (донорских) лимфоцитов в сочетании с Ронколейкином. Лечение без осложнений.

В апреле 2000 г. отмечено сохранение прежних размеров метастазов в шейно-надключичной зоне слева, в области левой боковой поверхности грудной клетки; наличие опухолевого инфильтрата в средней трети VII–X ребер слева. Однако появился ОП справа и асцит (признаков опухолевого перикардита не выявлено). Проведена внутрибрюшная иммунотерапия с ИЛ-2 (Ронколейкин) в суммарной дозе 10 млн и ЛАК. При контрольном УЗИ жидкости в брюшинной полости не выявлено.

В последующем проведено 2 курса системной химиотерапии препаратами гемзар и 5-фторурацил (гемзар 1800 мг в 1, 14, 28-й дни, 5-фторурацил 2000 мг во 2, 9, 15, 21 и 29-й дни, лейковорин 40 мг во 2, 9, 15, 21, 29-й дни). В интервалах между химиотерапией внутривенно вводили аллогенные ЛАК и Ронколейкин. Пациентка выписана с положительным эффектом.

Плазменная часть экссудата после элиминации опухолевых клеток может использоваться для поддержания гомеостаза онкологических больных посредством внутривенной реинфузии. Показания к таким реинфузиям обуславливались тяжестью общего состояния, безбелковыми отеками, гипоальбуминемией. Переносимость инфузий плазменной части, как было показано на 10 больных, была удовлетворительной, побочных эффектов не наблюдалось.

Из 85 больных, включенных в исследование, в 6 случаях плеврит сочетался с опухолевым перикардитом (рак молочной железы — 5, злокачественная мезотелиома — 1). У 5 больных раком яичников наряду с плевральным выпотом отмечался асцит, при этом у одной пациентки асцит сочетался с двусторонним плевритом. Кроме того, у 4 пациентов зарегистрирован двусторонний плеврит.

При сочетании плеврита с перикардитом больным одновременно пунктировали плевральную полость и перикард, устанавливали плевральный и перикардиальный катетеры, соединенные со стерильными емкостями для сбора экссудата. Выпот эвакуировали ежедневно и в зависимости от выраженности экссудации вводили по 0,5–1 млн МЕ Ронколейкина и 50–100 млн ЛАК в каждую полость. Больные переносили этот вариант иммунотерапии удовлетворительно, состояние пациентов оставалось стабильным, кардиореспираторных нарушений не отмечалось. В этих случаях ЛАК-клетки получали мононуклеарные лейкоциты из плеврального и перикардиального выпота. В одном случае, когда экссудат перикарда имел резко геморрагический характер и практически не содержал лимфоидных клеток, ЛАК готовили из плеврального выпота или мононуклеарных лейкоцитов крови больного и вводили в полость перикарда. В 2 случаях экссудативный плеврит и перикардит устранялись одновременно. У одной пациентки для прекращения экссудации в перикарде потребовался дополнительный недельный курс ИЛ-2/ЛАК-терапии для устранения плеврита. У этих пациентов не наблюдалось рецидива перикардита, в одном случае был зарегистрирован повторно (через 2 мес.) плеврит с противоположной стороны, который был излечен в результате проведенной иммунотерапии, в последующем возобновления экссудации в обоих гемитораках не наблюдалось в течение всего периода наблюдения (6 мес.).

В случаях сочетания плеврита с асцитом также может проводиться одновременное дренирование плевральной и брюшной полостей с ежедневной эвакуацией жидкости и введением ИЛ-2 в дозе 1 млн МЕ и 100 млн ЛАК в каждую полость. Как показали клинические исследования, 1–2 курса иммунотерапии позволяют устранить накопление экссудата как в плевральной, так и брюшной полости. Больные переносили этот вид иммунотерапии удовлетворительно, побочные эффекты проявлялись в виде умеренной температурной реакции, в одном случае на внутрибрюшинное введение ЛАК отмечались боли в животе спастического характера, которые купировались введением Но-шпы (2,0 мл внутримышечно).

При двусторонних плевритах у 2 из 4 пациентов проводилась сочетанная химиоиммунотерапия с введением

цисплатина (60 мг) в один гемиторакс и ИЛ-2/ЛАК в противоположный гемиторакс. Одновременное введение цитостатиков и ИЛ-2/ЛАК оказалось нецелесообразным, поскольку, несмотря на наличие клинического эффекта, переносимость сочетанной терапии была хуже по сравнению с иммунотерапией в монорежиме. Кроме того, химиотерапия приводит к снижению числа лимфоидных клеток в экссудате, что затрудняет последующую генерацию ЛАК. Пациентам с двусторонним плевритом может проводиться одновременное введение Ронколейкина и ЛАК в каждую плевральную полость. Эта терапия достаточно эффективна и не вызывает ухудшения состояния больных, а гипертермия имеет умеренный характер. У этих пациентов длительность полного эффекта превышала 1 мес.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что при сочетанных экссудативных формах злокачественных новообразований (сочетание плеврита с асцитом или перикардитом, а также двусторонние плевриты) ИЛ-2/ЛАК-терапия является эффективным и безопасным методом лечения.

Внутриполостная иммунотерапия хорошо переносима, даже пациентами, находящимися в тяжелом состоянии, которым невозможно проводить специфическое лечение. Как следует из данных, представленных в табл. 11.2, внутривнутриплевральная иммунотерапия у больных с ОП в отличие от химиотерапии вызывает гипертермию. Кроме того, по данным рентгенологического исследования и КТ ИЛ-2/ЛАК-терапия не приводит к образованию грубых напластований на плевре, характерных для плевродеза, вызванного цитостатиками или склерозирующими агентами.

Таблица 11.2. Сравнительная характеристика токсических реакций при внутривнутриплевральном и системном введении химиотерапии, ИЛ-2/ЛАК-терапии

| Токсическая реакция | % больных |
|-----------------------|-----------|
| Тошнота | 0 |
| Рвота | 0 |
| Повышение температуры | 94,0 |
| Нефротоксичность | 0 |
| Нейротоксичность | 0 |
| Гепатотоксичность | 0 |
| Ототоксичность | 0 |

| Токсическая реакция | % больных |
|--|-----------|
| Лейкопения | 0 |
| Лейкоцитоз | 0 |
| Ускоренная скорость оседания эритроцитов | 0 |
| Увеличение палочкоядерных нейтрофилов | 0 |

При иммунотерапии опухолевых перикардитов в условиях интраперикардального введения Ронколейкина и ЛАК происходит облитерация полости сердечной сумки, которая, как показали результаты эхокардиографии и ЭКГ, не влияла на ритм и сократимость миокарда. В двух случаях при эхокардиографии были высказаны подозрения о наличии в перикарде сгустков крови, но дополнительное исследование с использованием ангиографии показало лишь наличие облитерации полости.

У пациентов, получавших иммунотерапию, не отмечалось явлений тошноты или рвоты, а также иных диспептических расстройств. Изменения показателей периферической крови, функции почек и печени при данном виде лечения не регистрировались. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости иммунотерапии, требующие отмены лечения или снижения доз Ронколейкина и ЛАК, не были отмечены.

Практически у всех пациентов внутривенное введение Ронколейкина (ИЛ-2) и ЛАК сопровождалось повышением температуры тела. Вместе с тем гипертермию следует расценивать не только как побочную реакцию иммунотерапии, но и как проявление специфического действия ИЛ-2 и ЛАК – стимуляции системы иммунобиологического надзора, в том числе и его противоопухолевой составляющей (табл. 11.3).

Таблица 11.3. Степень выраженности гипертермии у больных при проведении внутривенной иммунотерапии Ронколейкином и аутологичными лимфокин-активированными киллерами

| Выраженность реакции | Количество больных (%) |
|---|------------------------|
| Отсутствие гипертермии | 8 (9,4) |
| Субфебрильная гипертермия (37,5 °С) | 60 (70,6) |
| I степень – легкая гипертермия (38,0–39,0 °С) | 10 (11,8) |
| II степень – умеренная гипертермия (> 39,0–40,0 °С) | 7 (8,2) |

Как правило, реакция гипертермии у больных проявлялась после 3–5 введений Ронколейкина и ЛАК, т.е. к концу первой недели курса иммунотерапии. Повышение температуры наступало обычно через 3–4 ч после введения и наблюдалось в течение 6–8 ч, после чего происходило постепенное снижение температуры до исходных значений. В большинстве случаев, согласно СТС АЕ v. 3.0, гипертермия была легкой или умеренной степени выраженности (до 38,5 °С) и не требовала медикаментозной коррекции. В отдельных случаях после наблюдения за больными в течение 6 ч и при отсутствии тенденции к снижению, когда температура тела пациентов превышала 38,5 °С, но не достигала 39 °С, перорально назначались нестероидные противовоспалительные средства. Прием аспирина в дозе 0,5 г перорально у этих пациентов приводил к снижению температуры тела до нормального физиологического уровня. В отдельных случаях, когда гипертермия была выраженной (39–39,5 °С), после 2 ч наблюдения реакция купировалась введением оксадола (1,0 мл внутримышечно).

Таким образом, иммунотерапия Ронколейкином (ИЛ-2) и аутологичными ЛАК практически не вызывает у больных побочных эффектов, за исключением явлений гипертермии, которая в большинстве случаев имеет умеренный характер, самостоятельно подвергается обратному развитию и обычно не требует фармакологической коррекции. Выраженная гипертермия эффективно купируется антипиретиками.

Результаты исследования иммунофенотипа аутологичных ЛАК показали, что на 3–5-е сутки после инкубации ИЛ-2 лимфоцитов экссудата *in vitro* увеличивалось количество CD4+/CD25+-клеток. Это может быть следствием трансформации лимфоцитов в активированные клетки под действием ИЛ-2. Однако введение в плевральную полость высоких доз ИЛ-2 может также стимулировать накопление и усиливать функциональную активность субпопуляции естественных регуляторных CD4+CD25+Foxp3+ Т-клеток, участвующих в формировании иммунологической толерантности и подавляющих противоопухолевую активность НК и Т-клеток [13, 14]. Возможность использования аутологичных ЛАК также ограничивается у больных, получавших предшествующее лечение химиопрепаратами, так как в этих случаях в экссудате лимфоидные клетки могут вовсе отсутствовать. Кроме того,

у ряда первичных больных концентрация опухолевых клеток в плевральном выпоте значительно превышает количество лимфоцитов, что не позволяет выделить в чистом виде мононуклеарные лейкоциты, пригодные для генерации ЛАК. Получить необходимый клеточный материал из периферической крови больных также не всегда представляется возможным, так как для этого требуется забор больших количеств крови (до 100 мл) или проведение аппаратного лейкофереза.

11.1.4. Эффективность внутриплеврального введения интерлейкина-2 и аллогенных лимфокин-активированных киллеров при опухолевых плевритах

Ранее было показано, что активированные ИЛ-2 лимфоциты доноров (аллогенные ЛАК или НК) обладают более высокой противоопухолевой цитотоксичностью, чем ЛАК онкологических больных. Аллогенные ЛАК были использованы для лечения химиорезистентных форм гемобластозов и солидных опухолей и показали хорошую эффективность и удовлетворительную переносимость [15–17].

Чтобы компенсировать недостаточную численность аутологичных лимфоцитов в опухолевых экссудатах и нивелировать супрессорную активность регуляторных CD4+CD25+Foxp3+ Т-клеток, для целей иммунотерапии ОП было предложено использовать активированные *ex vivo* аллогенные ЛАК в комбинации с Ронколейкином (ИЛ-2).

Характеристика 65 больных с ОП, включенных в исследование, дана в табл. 11.4.

Таблица 11.4. Характеристика больных, включенных в исследование внутриплевральной иммунотерапии

| Показатель | ИЛ-2/ЛАК-терапия | |
|--|--------------------------|--------------------------|
| | ИЛ-2-терапия (n = 30) | ИЛ-2-терапия (n = 35) |
| Мужчины, n | 4 | 7 |
| Женщины, n | 26 | 28 |
| Верифицированный диагноз (морфологически), n | 30 | 35 |
| Возраст, лет | 42–73 | 41–75 |

| Показатель | ИЛ-2/ЛАК-терапия | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| | ИЛ-2-терапия (n = 30) | ИЛ-2-терапия (n = 35) |
| Диагноз заболевания | | |
| Рак молочной железы | 16 | 22 |
| Рак яичников | 6 | 5 |
| Рак легкого | 4 | 5 |
| Рак почки | 3 | 3 |
| Меланома кожи | 1 | — |

Первой группе из 35 больных вводили только Ронколейкин (ИЛ-2). Пациенты второй группы внутривнутриплеврально получали Ронколейкин (ИЛ-2) и аллогенные ЛАК. Данная группа состояла из 30 больных.

Клиническая эффективность внутривнутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии составила 74%, в то время как использование Ронколейкина (ИЛ-2) в комбинации с аллогенными ЛАК приводило к полной или частичной регрессии экссудата в 93,3% (табл. 11.5). Рецидив экссудации при использовании Ронколейкина в монорежиме и Ронколейкина в сочетании с аллогенными ЛАК отмечался у 8 и 4 больных соответственно. Медиана выживаемость в этих двух группах была сходная и составила 7 мес. при применении Ронколейкина и 9 мес. при введении Ронколейкина и аллогенных ЛАК.

Таблица 11.5. Клиническая эффективность внутривнутриплевральной иммунотерапии интерлейкином-2 и интерлейкином-2 в комбинации с аллогенными лимфокин-активированными киллерами

| Эффективность | Иммунотерапия | | |
|--|------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | ИЛ-2 (n = 35) | ИЛ-2 + аллогенные ЛАК (n = 30) | Суммарно (n = 65) |
| Полный эффект, n (%) | 15 (43%) | 15 (50%) | 30 (46%) |
| Частичный эффект, n (%) | 11 (31%) | 13 (43,3%) | 24 (37%) |
| Отсутствие эффекта, n (%) | 9 (25,7%) | 2 (6,7%) | 11 (17%) |
| Суммарный ответ, n (%) | 26 (74%) | 28 (93,3%) | 54 (83%) |
| Рецидив плеврита после иммунотерапии, n (%) | 8 (23%) | 4 (13,3%) | 12 (18%) |
| Медиана выживаемости, мес. (диапазон) | 7 (1-26) | 9 (1-28) | — |

Для достижения клинического эффекта при введении одного Ронколейкина (ИЛ-2) требовалось от 2 до 4 курсов, в то время как полная или частичная регрессия экссудата при введении Ронколейкина (ИЛ-2) в комбинации с аллогенными ЛАК наступала в большинстве случаев после первого курса иммунотерапии. По данным рентгенологического исследования и КТ ИЛ-2/ЛАК-терапия не приводила к образованию грубых напластований на плевре, характерных для плевродеза, вызванного цитостатиками или склерозирующими агентами. Уменьшение и прекращение экссудации подтверждалось рентгенологически (рис. 11.6).

Цитологическая характеристика экссудата на фоне введения Ронколейкина (ИЛ-2) и аллогенных лимфоки-активированных киллеров

Генерация аллогенных ЛАК показала, что активация Ронколейкином мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров приводила к пролиферации лимфоцитов, при этом появлялись лимфоидные элементы различной степени зрелости, регистрировались единичные митозы (рис. 11.7, см. цв. вклейку).

До лечения в экссудате присутствовали в основном опухолевые клетки. После 1–2 нед. лечения в экссудате определялись лишь единичные опухолевые клетки с явлениями дегенерации, окруженные значительным количеством активированных лимфоидных клеток. В остаточных количествах экссудата при наступлении клинического эффекта опухолевые клетки, как правило, отсутствовали, выявлялись только лимфоидные клетки, единичные нейтрофилы и гистиоциты (рис. 11.8, 11.9, см. цв. вклейку).

Следует отметить, что замедление или прекращение экссудации наступало только в тех случаях, когда в плевральном выпоте отмечалось значительное количество активированных лимфоидных клеток с наличием иммунобластов и митозов.

Следовательно, внутривлепральное введение Ронколейкина (ИЛ-2) в монорежиме вызывает регрессию злокачественного выпота у 74% больных. При этом в отличие от предыдущих исследований [7] были использованы низкие дозы ИЛ-2 (1 млн МЕ Ронколейкина), практически не вызывающие побочных эффектов. Комбинация Ронколейкина (ИЛ-2) с аллогенными ЛАК более эффективна и вызывает полную или частичную регрессию плеврального выпота у 93% пациентов. При этом

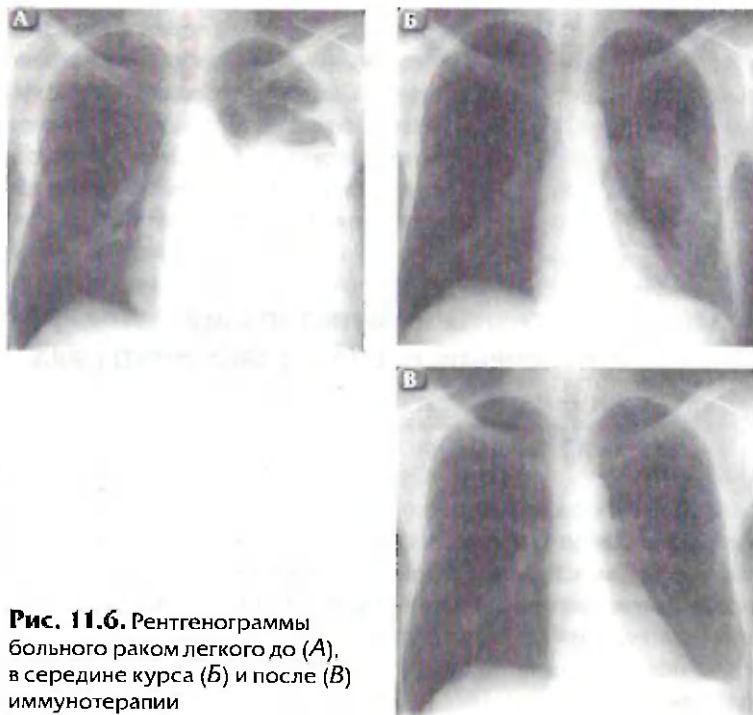


Рис. 11.6. Рентгенограммы больного раком легкого до (А), в середине курса (Б) и после (В) иммунотерапии

для достижения регрессии экссудации при введении в плевральную полость одного ИЛ-2 требуется более длительное лечение, чем при использовании комбинации ИЛ-2 и ЛАК.

Следовательно, использование аллогенных ЛАК расширяет возможности данного метода, так как позволяет проводить иммунотерапию даже в тех случаях, когда в экссудате либо отсутствуют лимфоциты, либо возникают технические сложности их отделения от многочисленных опухолевых клеток экссудата. Кроме того, использование аллогенных ЛАК, полученных из лимфоцитов здоровых доноров, позволяет избежать отрицательного воздействия на активность ЛАК супрессорной субпопуляции регуляторных Т-клеток, выявляемых в опухолевых экссудатах пациентов [18].

В популяции аллогенных ЛАК не содержится значимого количества регуляторных Т-клеток, а включение в схему иммунотерапии аллогенных ЛАК снижает потребность в ИЛ-2 и уменьшает вероятность стимуляции супрессоров, исходно повышенных в плевральных выпотах [19].

Для достижения клинического эффекта при введении одного Ронколейкина (ИЛ-2) требовалось от 2 до 4 курсов, в то время как полная или частичная регрессия экссудата при введении Ронколейкина (ИЛ-2) в комбинации с аллогенными ЛАК наступала в большинстве случаев после первого курса иммунотерапии. По данным рентгенологического исследования и КТ ИЛ-2/ЛАК-терапия не приводила к образованию грубых напластований на плевре, характерных для плевродеза, вызванного цитостатиками или склерозирующими агентами. Уменьшение и прекращение экссудации подтверждалось рентгенологически (рис. 11.6).

Цитологическая характеристика экссудата на фоне введения Ронколейкина (ИЛ-2) и аллогенных лимфокин-активированных киллеров

Генерация аллогенных ЛАК показала, что активация Ронколейкином мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров приводила к пролиферации лимфоцитов, при этом появлялись лимфоидные элементы различной степени зрелости, регистрировались единичные митозы (рис. 11.7, см. цв. вклейку).

До лечения в экссудате присутствовали в основном опухолевые клетки. После 1–2 нед. лечения в экссудате определялись лишь единичные опухолевые клетки с явлениями дегенерации, окруженные значительным количеством активированных лимфоидных клеток. В остаточных количествах экссудата при наступлении клинического эффекта опухолевые клетки, как правило, отсутствовали, выявлялись только лимфоидные клетки, единичные нейтрофилы и гистиоциты (рис. 11.8, 11.9, см. цв. вклейку).

Следует отметить, что замедление или прекращение экссудации наступало только в тех случаях, когда в плевральном выпоте отмечалось значительное количество активированных лимфоидных клеток с наличием иммунобластов и митозов.

Следовательно, внутривнутриплевральное введение Ронколейкина (ИЛ-2) в монорежиме вызывает регрессию злокачественного выпота у 74 % больных. При этом в отличие от предыдущих исследований [7] были использованы низкие дозы ИЛ-2 (1 млн МЕ Ронколейкина), практически не вызывающие побочных эффектов. Комбинация Ронколейкина (ИЛ-2) с аллогенными ЛАК более эффективна и вызывает полную или частичную регрессию плеврального выпота у 93 % пациентов. При этом

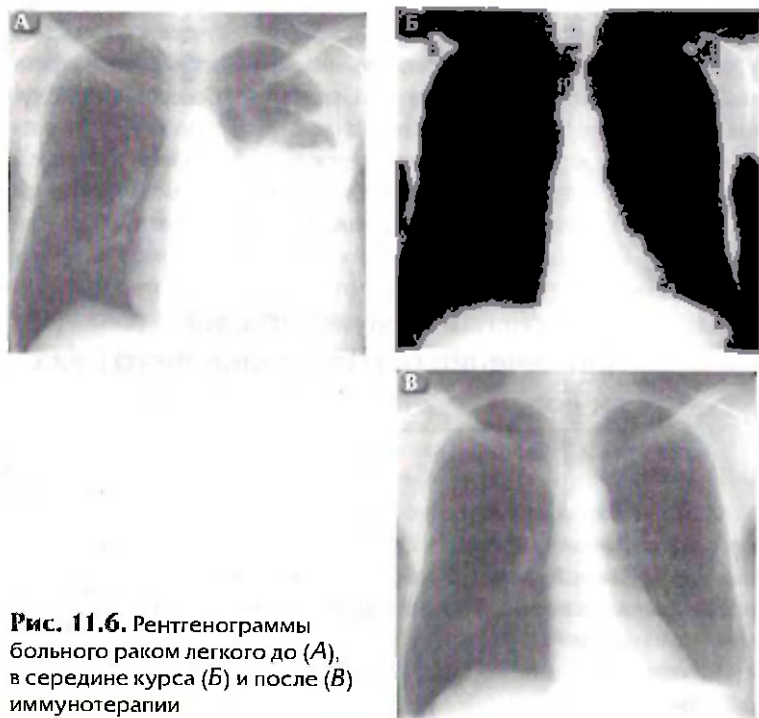


Рис. 11.6. Рентгенограммы больного раком легкого до (А), в середине курса (Б) и после (В) иммунотерапии

для достижения регрессии экссудации при введении в плевральную полость одного ИЛ-2 требуется более длительное лечение, чем при использовании комбинации ИЛ-2 и ЛАК.

Следовательно, использование аллогенных ЛАК расширяет возможности данного метода, так как позволяет проводить иммунотерапию даже в тех случаях, когда в экссудате либо отсутствуют лимфоциты, либо возникают технические сложности их отделения от многочисленных опухолевых клеток экссудата. Кроме того, использование аллогенных ЛАК, полученных из лимфоцитов здоровых доноров, позволяет избежать отрицательного воздействия на активность ЛАК супрессорной субпопуляции регуляторных Т-клеток, выявляемых в опухолевых экссудатах пациентов [18].

В популяции аллогенных ЛАК не содержится значимого количества регуляторных Т-клеток, а включение в схему иммунотерапии аллогенных ЛАК снижает потребность в ИЛ-2 и уменьшает вероятность стимуляции супрессоров, исходно повышенных в плевральных выпотах [19].

Аллогенные ЛАК характеризуются хорошей переносимостью и вызывают сходные с аутологичными ЛАК побочные эффекты, проявляющиеся гипертермией, которая в большинстве случаев имеет умеренный характер, самостоятельно подвергается обратному развитию и обычно не требует фармакологической коррекции. Выраженная гипертермия эффективно купируется нестероидными противовоспалительными препаратами.

11.2. Адоптивная иммунотерапия при лечении распространенного рака яичников

А. Г. Блюменберг

У больных раком яичников течение заболевания нередко осложняется опухолевыми серозитами, чаще всего опухолевыми асцитами. При неэффективности системной терапии используются различные варианты внутрисплетных введений цитостатиков и иммуномодуляторов. Проведенные клинические исследования показали, что высокой эффективностью обладают цитокины ИЛ-2 и ИФН- γ [20]. В частности, внутрибрюшинное введение ИФН- γ приводило к полному ответу у 23 % больных с химиорезистентными формами рака яичников, осложненными асцитами [12].

Внутрибрюшинное введение ИЛ-2 в комбинации с ИФН- γ и активированными *ex vivo* лимфоцитами, выделенными из асцита, приводило не только к регрессии экссудата у больных раком яичников, но также в ряде случаев отмечалось значительное снижение маркера СА-125 и стабилизация заболевания до 18 мес. [22].

11.2.1. Иммунотерапия плевритов и асцитов при платино-таксанорезистентных формах рака яичников

В РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН 46 больных с платино-таксанорезистентными формами рака яичников, течение заболевания у которых осложнилось прогрессированием процесса и появлением жидкости в плевральной и/или брюшной полости, получали адоптивную ИЛ-2/ЛАК-терапию. Средний возраст па-

циенток составил $52,4 \pm 3,1$ года. По поводу основного заболевания пациентки получали лечение на протяжении 1,5–5,5 года. Из 46 наблюдаемых больных предшествующее внутрисплетное введение цитостатиков имело место у 12 (26,1%) женщин; 3 пациенткам проводилось внутривлепуральное, а 8 – внутривлепуральное введение ТиоТэфа или циклофосфана. Данное лечение было неэффективным. К началу локальной адоптивной иммунотерапии ИЛ-2/ЛАК опухолевый процесс был распространенным и помимо патологических выпотов в брюшную и/или плепуральную полость у пациенток также имелись другие множественные проявления опухолевого поражения.

После клинического обследования и цитологического подтверждения наличия злокачественных клеток в эксудате пациенткам под местной анестезией выполнялся лапароцентез и/или плепуральная пункция, эвакуировалось максимально возможное количество жидкости, и устанавливался катетер наиболее подходящего диаметра. Полость была дренирована в течение 2–3 нед. Эксудат эвакуировался в стерильные емкости с гепарином и путем центрифугирования разделялся на клеточную и плазменную части. Все больные получили 1–3 курса ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии. Каждый курс состоял из 5–20 внутривлепуральных инъекций Ронколейкина (ИЛ-2) в дозе $1,0 \times 10^6$ МЕ и 2–8 инъекций аллогенных ЛАК по $50–100 \times 10^6$ клеток. Курс лечения продолжался 1–3 нед.

Эффективность лечения оценивали по срокам накопления эксудата, уровню маркера СА-125, данным рентгенологического и ультразвукового исследований, также изучались иммунологические показатели.

Клиническая эффективность локорегиональной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии плепуритов и асцитов при платино-таксанорезистентных формах рака яичников приближается к 90% (табл. 11.6).

Таблица 11.6. Эффективность локальной адоптивной иммунотерапии асцитов и плепуритов у больных с прогрессирующим раком яичников

| Эффективность | Асцит (n = 28) | Плепурит (n = 18) | Всего (n = 46) |
|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| Полная ремиссия | 14 (50%) | 14 (77,7%) | 28 (60,8%) |
| Частичная ремиссия | 10 (35,7%) | 2 (11,1%) | 12 (26,1%) |
| Общий эффект | 24 (85,7%) | 16 (88,8%) | 40 (86,9%) |
| Без эффекта | 4 (14,3%) | 2 (11,2%) | 6 (13,1%) |

Накопление экссудата в первые двое суток до начала ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии составляло от 200 до 6000 мл/сут (в случае асцитов). Во всех случаях у больных удалялся серозный или серозно-геморрагический экссудат (относительная плотность 1,015–1,018, содержание белка 25–30 г/л). Как правило, клинический эффект наступал после 2–3 нед. внутривентрикулярной иммунотерапии, при стойкой экссудации лечение продолжали до 1 мес. Через месяц после окончания ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии эффект сохранялся у 40 (87%) больных. У остальных пациенток отмечалось накопление экссудата в прежнем режиме, хотя состояние их на фоне лечения улучшилось за счет систематической полной эвакуации экссудата. У 28 женщин отмечена полная ремиссия, на фоне которой продолжена химиотерапия гексаленом. Следует отметить, что выраженный эффект наступал только в тех случаях, когда в выпоте отмечалось значительное количество активированных лимфоидных клеток с наличием иммунобластов и митозов. После проведения курса адоптивной иммунотерапии наблюдалось снижение показателей опухолевого маркера СА-125 у 23 (50%) больных, нормализация иммунного статуса – у 34 (74%) пациенток и уменьшение размеров метастазов – у 6 (13,1%) больных.

Проведенное лечение приводило к увеличению числа лимфоцитов периферической крови, за счет как НК (CD16+), так и цитотоксических CD8+ Т-клеток.

Исследование показало эффективность предложенного метода адоптивной иммунотерапии при серозитах у больных диссеминированным раком яичников. Кроме того, в процессе иммунотерапии из экссудата исчезали опухолевые клетки, проходя стадию дегенерации (вакуолизация цитоплазмы и ядер), на фоне увеличения в выпоте активированных лимфоцитов типа иммунобластов. На фоне ИЛ-2/ЛАК-терапии отмечалась стабилизация заболевания, клиническая ремиссия превышала 18 мес.

Принципиальным положительным моментом является возможность проведения химиотерапии после эффективной иммунотерапии.

Оценка переносимости внутривентрикулярной адоптивной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии у больных раком яичников выявила следующие побочные реакции:

- повышение температуры тела больных до 38,5 °С, носившее кратковременный (до 4 ч) характер. Данная реакция наблюдалась у 38 (82,6 %) пациенток после введения ИЛ-2;
- при внутрибрюшинном введении ЛАК у 14 (30,4 %) больных отмечались спастические боли, которые купировались спазмолитиками.

Вопросы качества и продолжительности жизни у больных с прогрессирующим онкологическим заболеванием являются особенно актуальными в настоящее время. Очевидно, что развитие плеврита и/или асцита на том или ином этапе опухолевого процесса ухудшает качество и сокращает продолжительность жизни больных диссеминированным раком яичников. Особый интерес представляет поиск новых противоопухолевых лекарств и методов лечения ОП и асцитов. Согласно представленным данным, метод внутрисплетной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии ОП и асцитов целесообразно применять у больных при рецидивах и прогрессировании рака яичников при неэффективной химиотерапии, а также при индивидуальной непереносимости цитостатиков.

При проведении ИЛ-2/ЛАК-терапии отмечается деградация и последующее исчезновение из плеврального выпота опухолевых клеток на фоне повышения числа активированных лимфоидных элементов у 87 % больных, а также снижение уровня маркера СА-125 у 50% и частичная регрессия опухолей у 13 % пациенток.

Внутрибрюшинное введение ИЛ-2 и ЛАК после циторедуктивной операции и/или 6–8 курсов химиотерапии приводит к нормализации параметров иммунитета у больных распространенным раком яичников и способствует лучшей переносимости последующей химиотерапии.

Применение ИЛ-2/ЛАК-терапии после комбинированного лечения при выраженных иммунодепрессивных состояниях способствует восстановлению иммунологических показателей и увеличению содержания активированных лимфоцитов. Адоптивная иммунотерапия может оказывать нормализующее влияние на иммунный статус онкологических больных и способствовать регрессии ОП и асцитов при платино-таксанорезистентных формах рака яичников.

11.3. Иммунотерапия опухолевых перикардитов

Существует небольшое количество клинических исследований с использованием внутривнутриперикардального введения цитокинов, прежде всего ИЛ-2 и ЛАК, выделенных из перикардального экссудата больного. В частности, Тоh и соавт. [23] на 4 больных со злокачественным перикардальным выпотом была продемонстрирована клиническая эффективность и хорошая переносимость данного метода. Единственным побочным эффектом была лихорадка I степени.

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 23 пациентам по поводу метастатического экссудативного перикардита была проведена внутривнутриперикардальная иммунотерапия с использованием рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкин, Биотех, Россия) и аутологичных ЛАК-клеток, генерированных из лимфоцитов перикардального экссудата больных.

У 10 (43%) больных перикардит был проявлением опухолевой диссеминации при мелкоклеточном раке легкого, у 9 (40%) — при раке молочной железы и у 4 (17%) был обусловлен прогрессированием рака яичников. Исследуемая группа пациентов включала 14 женщин и 9 мужчин в возрасте от 35 до 70 лет. Состояние больных к моменту проведения иммунотерапии у всех расценено как средней тяжести. До начала внутривнутриперикардальной иммунотерапии все пациенты получали соответствующее комбинированное или комплексное лечение, как правило, хирургическое в комбинации с химио-, гормоно- или радиотерапией. Перед началом иммунотерапии из полости перикарда удалялось от 300–1000 мл серозного, серозно-геморрагического или геморрагического экссудата. Во всех 23 случаях до проведения иммунотерапии выполнялось цитологическое исследование перикардального выпота.

Для проведения иммунотерапии полость перикарда под местной анестезией дренировалась и катетеризировалась на 7–10 дней. Для этой цели использовали набор «Плеврокан» (В. Braun, США). Перед введением препарата полость перикарда максимально осушалась. Ронколейкин вводился в пораженную полость перикарда в дозе 0,5–1 млн МЕ (0,5–1 мг) в 10 мл физиологического раствора на 1–5-е и 8–9-е сутки (суммарная доза — 5–7 млн МЕ). Генерированные из мононуклеарных лейкоцитов экссудативной жидкости и ресуспен-

дированные в физиологическом растворе ЛАК вводили через установленный катетер в пораженную полость в дозе 110–150 млн клеток (суммарная доза – 1100–1500 млн клеток) также на 1–5-е и 8–9-е сутки проводимого лечения. Контрольную эхокардиографию или УЗИ перикарда проводили после иммунотерапии, а также через 1 мес. и далее в динамике через каждые 3 мес.

При проведении внутривнутриперикардальной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии полный эффект отмечен у 18 (78,1 %) пациентов, частичный эффект (наличие небольшого количества жидкости в перикарде) – у 4 (17,3 %) пациентов. В 1 (4,3 %) случае зарегистрировано отсутствие эффекта. Суммарная эффективность внутривнутриперикардальной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии составила 95,4 %. Повторное накопление выпота в перикарде отмечено у 2 (8,6 %) больных в сроки от 6 до 12 мес. после лечения (табл. 11.7).

Внутриперикардальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия хорошо переносима и практически не вызывала у больных побочных эффектов, за исключением явлений умеренной гипертермии, которая легко купировалась антипиретиками.

Для подтверждения факта активации лимфоцитов проведено исследование субпопуляционного состава генерированных ЛАК, позволившее выявить увеличение активированных форм лимфоцитов (CD25+). Кроме того, данный метод позволяет установить, что около 70 % лимфоцитов составляют Т-клетки, 35 % относятся к CD8+ (т.е. могут представлять цитотоксическую субпопуляцию), а 25 % составляют НК-клетки, которые играют важную роль в лизисе опухолевых клеток. Эти результаты указывают на то, что иммунотерапия приводит к активации киллерного звена иммунитета.

Имунофенотип ЛАК, генерированных из мононуклеарных лейкоцитов перикардального экссудата при инкубации их *ex vivo* в присутствии ИЛ-2, характеризовался повышенной экспрессией антигена НК CD16, активационных антигенов CD25, CD38, а также антигена главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR и молекулы адгезии CD58, по сравнению с уровнем экспрессии этих маркеров на интактных мононуклеарных лейкоцитах, выделенных из перикардального выпота. Эти результаты позволяют предположить, что внутривнутриперикардальная иммунотерапия может быть эффективна и безопасна для лечения опухолевых перикардитов. Внутривнутриперикарди-

Иммунотерапия опухолевых серозитов

Таблица 11.7. Клиническая эффективность внутриперикардиальной иммунотерапии опухолевых перикардитов

| Основной диагноз | Количество больных | | Клинический эффект | |
|------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|--|
| | Полный | Частичный | Без эффекта | |
| Немелкоклеточный рак легкого | 7 (30,4%) | 2 (8,7%) | 1 (4,3%) | |
| Рак молочной железы | 9 (40,1%) | 1 (4,3%) | 0 | |
| Рак яичников | 2 (8,6%) | 1 (4,3%) | 0 | |
| Всего | 18 (78,1%) | 4 (17,3%) | 1 (4,3%) | |

альная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия у больных с метастатическим экссудативным перикардитом показала высокую эффективность (95,7%). Клинический эффект у всех больных подтверждался эхокардиографией и УЗИ. Данный вид иммунотерапии был хорошо переносим и практически не вызывал побочных эффектов, за исключением умеренной температурной реакции у некоторых пациентов. Клинические эффекты ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии обусловлены лизисом опухолевых клеток аутологичными ЛАК. Учитывая высокую эффективность и хорошую переносимость, внутриперикардиальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия при опухолевых перикардитах может рассматриваться как один из этапов комбинированного и/или комплексного лечения больных с диссеминированными злокачественными новообразованиями.

Таким образом, внутрисерозная иммунотерапия с использованием Ронколейкина (ИЛ-2) и ЛАК по своей эффективности не уступает действию склерозирующих агентов, однако в отличие от последних иммунотерапия характеризуется меньшими побочными эффектами. Кроме того, активация киллерных субпопуляций лимфоцитов в полостях за счет введения ИЛ-2 и переноса ЛАК в отличие от неспецифического действия склеротерапии оказывает противоопухолевый эффект. Цитотоксичность

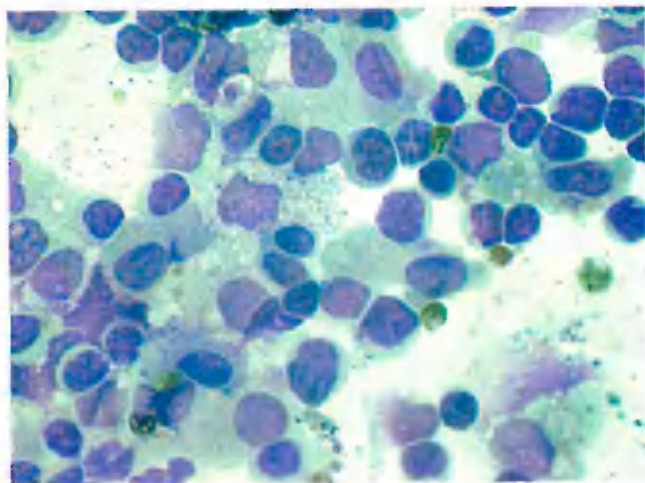


Рис. 11.7. Активированные *ex vivo* с помощью интерлейкина-2 МНК экссудата. В культуре активированных лимфоцитов преобладают клетки типа иммунобластов и пролимфоцитов, некоторые из которых находятся в состоянии митоза. Окраска азур-эозином; $\times 900$



Рис. 11.8. Больная Б. Рак яичников. Цитограмма опухолевого экссудата до начала иммунотерапии. Представлен конгломерат опухолевых клеток, а также незначительное количество зрелых лимфоцитов. Окраска азур-эозином; $\times 400$

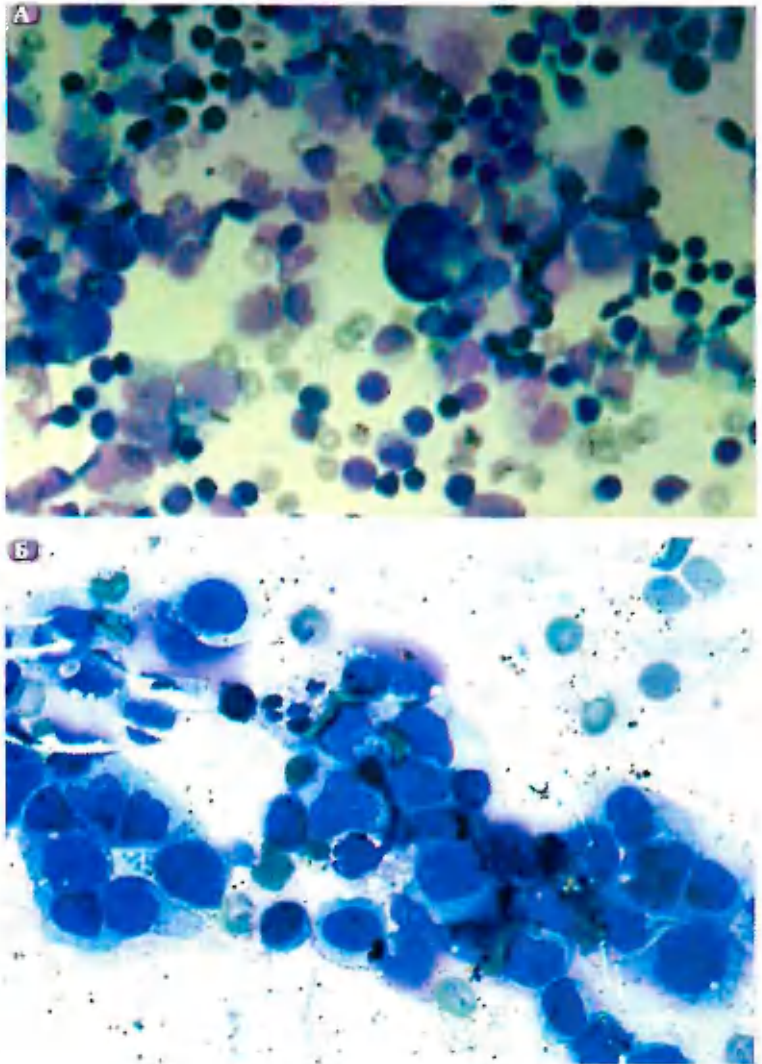


Рис. 11.9. Больная Б. Рак яичников. Цитогаммы опухолевого экссудата после проведения иммунотерапии. После введения интерлейкина-2 и аллогенных лимфокин-активированных киллеров обнаруживались единичные опухолевые клетки в стадии деградации, окруженные активированными лимфоцитами типа иммунобластов и пролимфоцитов (А); в остаточных количествах экссудата в конце лечебного курса опухолевые клетки отсутствовали, отмечались апоптотические тельца и активированные лимфоциты (Б). Окраска азур-зоенином; $\times 900$

аутологичных ЛАК, как показано в опытах *in vitro*, по отношению к свежее выделенным опухолевым клеткам экссудата значительно превышает исходную киллерную активность мононуклеарных лейкоцитов. Это явление, очевидно, обусловлено активацией НК, о чем свидетельствует повышение НК-активности ЛАК при испытании *in vitro*. ЛАК способны реализовать свой противоопухолевый потенциал и при внутриполостном введении. Это подтверждается цитологическими исследованиями, показавшими, что ЛАК в плевральном выпоте окружают опухолевые клетки, вызывая их деградацию и последующую гибель.

Следовательно, ИЛ-2/ЛАК-иммуноterapia расширяет возможности противоопухолевого лечения. Более того, она имеет преимущества по сравнению с традиционными методами. В отличие от неспецифических склерозирующих агентов (гальк, тетрациклин, доксициклин и т. п.), приводящих к развитию грануляционной ткани, которая затем инфильтрируется опухолью, иммуноterapia стимулирует местный противоопухолевый клеточный иммунитет, приводит к лизису опухолевых клеток. Ее также выгодно отличает от химиотерапии отсутствие проявлений токсичности, возможность применения в случаях лекарственной резистентности.

Высокая эффективность и безопасность дает основание рекомендовать комбинацию Ронколейкина (ИЛ-2) и ЛАК в качестве первой линии терапии ОП. Поскольку Ронколейкин (ИЛ-2) позволяет достичь клинических эффектов более чем в 70% случаев, иммуноterapia может быть начата с внутриплевральных введений низких доз Ронколейкина (1 млн МЕ), при недостаточной эффективности локорегиональная ИЛ-2-терапия должна быть дополнена введением ЛАК. В качестве источника для генерации ЛАК целесообразно использовать аллогенные лимфоциты здоровых доноров, что исключает возможность стимуляции супрессорных субпопуляций лимфоцитов.

Внутриплевральная иммуноterapia может рассматриваться как один из этапов комбинированного и/или комплексного лечения больных с диссеминированными злокачественными новообразованиями. Учитывая высокую эффективность, хорошую переносимость и простоту применения, внутриполостная иммуноterapia после дальнейшего изучения может

быть рекомендована для широкого использования в онкологической практике для лечения опухолевых серозитов.

Литература

1. *Sutlu T., Alici E.* Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Int. Med.* 2009; 266(2): 154–181.
2. *Margolin K.* Cytokine therapy in cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2008; 8: 1495–1505.
3. *Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M. et al.* Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313: 1485–1492.
4. *Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M. et al.* A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 889–897.
5. *Eggermont A. M., Punt C. J., Slingerland R. et al.* Intrapleural administration of interleukin 2 in pleural mesothelioma: a phase I-II study. *Br. J. Cancer.* 1995; 72: 1283–1288.
6. *Yasumoto K., Mibazaki K., Nagashima A. et al.* Induction of Lymphokine-activated Killer Cells by Intrapleural Instillations of Recombinant Interleukin-2 in Patients with Malignant Pleurisy Due to Lung Cancer. *Cancer Res.* 1987; 47: 2184–2187.
7. *Masotti A., Fumagalli L., Morandini G. C.* Intrapleural administration of recombinant interleukin-2 in non-small cell lung cancer with neoplastic pleural effusion. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 1997; 52: 225–228.
8. *Liu X., Li D., Zhang C. et al.* Treatment of 121 patients with malignant effusion due to advanced lung cancer by intrapleural transfer of autologous or allogenic LAK cells combined with rIL-2. *Med. Sci. J.* 1993; 8: 186–189.
9. *Давыдов М. И., Нормантович В. А., Киселевский М. В. и др.* Адоптивная иммунотерапия при опухолевых плевритах: клинико-лабораторное исследование. *Российский онкологический журнал.* 2000; 6: 14–17.
10. *Киселевский М. В.* Адоптивная иммунотерапия при злокачественных опухолях. *Вестник РАМН.* 2003; 1: 40–44.
11. *Blanchard D. K., Kavanagh J. J., Sinkovics J. G.* Infiltration of interleukin-2-inducible killer cells in ascitic fluid and pleural effusions of advanced cancer patients. *Cancer Res.* 1988; 48: 6321–6327.
12. *Luclvero G., Pierucci G., Bonomo L.* Lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. *Eur. Respir. J.* 1988; 1: 337–340.

13. *Chen Y-Q., Shi H-Z., Qin X-J. et al.* CD4+CD25+ Regulatory T Lymphocytes in Malignant Pleural Effusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172: 1434–1439.
14. *Kobayashi N., Hiraoka N., Yamagami W. et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis, *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 902–911.
15. *Ruggeri L., Mancusi A., Capanni M. et al.* Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17: 211–217.
16. *Ruggeri L., Capanni M., Urbani E. et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002; 295: 2097–2100.
17. *Ren X. B., Yu J. P., Cao S. et al.* Antitumor effect of large doses IL-2-activated HLA haploidentical peripheral blood stem cells on refractory metastatic solid tumor treatment. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2007; 22: 223–234.
18. *Ralainirina N., Poli A., Michel T. et al.* Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81: 144–153.
19. *Чикилева И. О., Велижева Н. П., Шубина И. Ж. и др.* Содержание Т-регуляторных лимфоцитов CD4+CD25+Foxp3+ в популяции лимфокин-активированных киллеров. *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.* 2008; 3: 16–25.
20. *Nagamine I., Yamaguchi Y., Ohara M. et al.* Induction of gamma delta T cells using zoledronate plus interleukin-2 in patients with metastatic cancer. *Hiroshima J. Med. Sci.* 2009; 58: 37–44.
21. *Pujade-Lauraine E., Guastella J. P., Colombo N. et al.* Intraperitoneal recombinant interferon- γ in ovarian cancer patients with residual disease at second-look laparotomy. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 343–350.
22. *Freedman R. S., Kudelka A. P., Kavanagh J. J.* Clinical and Biological Effects of Intraperitoneal Injections of Recombinant Interferon- γ and Recombinant Interleukin 2 with or without Tumor-infiltrating Lymphocytes in Patients with Ovarian or Peritoneal Carcinoma *Clinical. Cancer Res.* 2000; 6: 22681.
23. *Toh U., Fujii T., Seki N. et al.* Characterization of IL-2-activated TILs and their use in intrapericardial immunotherapy in malignant pericardial effusion. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(10): 1219–1227.

быть рекомендована для широкого использования в онкологической практике для лечения опухолевых серозитов.

Литература

- Иммуноterapia опухолевых серозитов
1. *Sutlu T., Alici. E.* Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. J. Int. Med. 2009; 266(2): 154–181.
 2. *Margolin K.* Cytokine therapy in cancer. Expert. Opin. Biol. Ther. 2008; 8: 1495–1505.
 3. *Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M. et al.* Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. N. Engl. J. Med. 1985; 313: 1485–1492.
 4. *Rosenberg S. A., Lotze M. T., Muul L. M. et al.* A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. N. Engl. J. Med. 1987; 316: 889–897.
 5. *Eggermont A. M., Punt C. J., Slingerland R. et al.* Intrapleural administration of interleukin 2 in pleural mesothelioma: a phase I-II study. Br. J. Cancer. 1995; 72: 1283–1288.
 6. *Yasumoto K., Mivazaki K., Nagashima A. et al.* Induction of Lymphokine-activated Killer Cells by Intrapleural Instillations of Recombinant Interleukin-2 in Patients with Malignant Pleurisy Due to Lung Cancer. Cancer Res. 1987; 47: 2184–2187.
 7. *Masotti A., Fumagalli L., Morandini G. C.* Intrapleural administration of recombinant interleukin-2 in non-small cell lung cancer with neoplastic pleural effusion. Monaldi Arch. Chest. Dis. 1997; 52: 225–228.
 8. *Liu X., Li D., Zhang C. et al.* Treatment of 121 patients with malignant effusion due to advanced lung cancer by intrapleural transfer of autologous or allogenic LAK cells combined with rIL-2. Med. Sci. J. 1993; 8: 186–189.
 9. *Давыдов М. И., Нормантович В. А., Киселевский М. В. и др.* Адоптивная иммуноterapia при опухолевых плевритах: клинико-лабораторное исследование. Российский онкологический журнал. 2000; 6: 14–17.
 10. *Киселевский М. В.* Адоптивная иммуноterapia при злокачественных опухолях. Вестник РАМН. 2003; 1: 40–44.
 11. *Blanchard D. K., Kavanagh J. J., Sinkovics J. G.* Infiltration of interleukin-2-inducible killer cells in ascitic fluid and pleural effusions of advanced cancer patients. Cancer Res. 1988; 48: 6321–6327.
 12. *Lucifero G., Pterucci G., Bonomo L.* Lymphocyte subsets in peripheral blood and pleural fluid. Eur. Respir. J. 1988; 1: 337–340.

13. *Chen Y-Q., Shi H-Z., Qin X-J. et al.* CD4+CD25+ Regulatory T Lymphocytes in Malignant Pleural Effusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172: 1434–1439.
14. *Kobayashi N., Hiraoka N., Yamagami W. et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis, *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 902–911.
15. *Ruggeri L., Mancusi A., Capanni M. et al.* Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; 17: 211–217.
16. *Ruggeri L., Capanni M., Urbani E. et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002; 295: 2097–2100.
17. *Ren X. B., Yu J. P., Cao S. et al.* Antitumor effect of large doses IL-2-activated HLA haploidentical peripheral blood stem cells on refractory metastatic solid tumor treatment. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2007; 22: 223–234.
18. *Ralainirina N., Poli A., Michel T. et al.* Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81: 144–153.
19. *Чикилева И. О., Велижева Н. П., Шубина И. Ж. и др.* Содержание Т-регуляторных лимфоцитов CD4+CD25+Foxp3+ в популяции лимфокин-активированных киллеров. *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.* 2008; 3: 16–25.
20. *Nagamine I., Yamaguchi Y., Ohara M. et al.* Induction of gamma delta T cells using zoledronate plus interleukin-2 in patients with metastatic cancer. *Hiroshima J. Med. Sci.* 2009; 58: 37–44.
21. *Pujade-Lauraine E., Guastella J. P., Colombo N. et al.* Intraperitoneal recombinant interferon- γ in ovarian cancer patients with residual disease at second-look laparotomy. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 343–350.
22. *Freedman R. S., Kudelka A. P., Kavanagh J. J.* Clinical and Biological Effects of Intraperitoneal Injections of Recombinant Interferon- γ and Recombinant Interleukin 2 with or without Tumor-infiltrating Lymphocytes in Patients with Ovarian or Peritoneal Carcinoma. *Clinical. Cancer Res.* 2000; 6: 22681.
23. *Toh U., Fujii T., Seki N. et al.* Characterization of IL-2-activated TILs and their use in intrapericardial immunotherapy in malignant pericardial effusion. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(10): 1219–1227.



Рекомбинантный ИНТЕРЛЕЙКИН-2 ЧЕЛОВЕКА



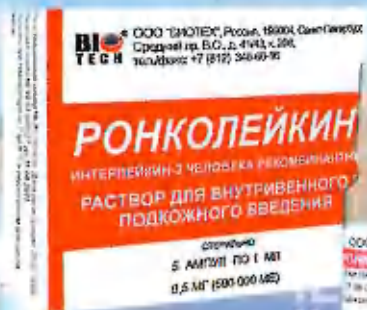
7.1.40.

АКТИВАЦИЯ ФАКТОРОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЗАЩИТЫ

РОНКОЛЕЙКИН® В ОНКОЛОГИИ

- ✓ Достоверное увеличение медианы жизни при некоторых онкологических заболеваниях
- ✓ Достоверное снижение частоты инфекционных осложнений

Рак почки
 Рак мочевого пузыря
 Опухолевые плевриты
 Колоректальный рак
 Меланома
 Рак шейки матки



www.biotech.spb.ru
☎ (812) 346-60-16

Регистрационное удостоверение № ПС-001610
на препарат Roncoleykin

IL-2
TNF-α