

На правах рукописи

СИНЕЛЬНИКОВ ИГОРЬ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ EX VIVO
АКТИВИРОВАННЫХ АЛЛОГЕННЫХ НК-КЛЕТОК ПРИ
МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ПЛЕВРИТАХ**

14.01.12 - онкология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

МОСКВА – 2012г.

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ректор член-корреспондент РАМН, профессор П.В. Глыбочко) и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Российской академии медицинских наук (директор – академик РАН и РАМН, профессор М.И. Давыдов).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Демидов Лев Вадимович
Киселевский Михаил Валентинович

Официальные оппоненты:

Бычков Марк Борисович

доктор медицинских наук, профессор
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН,
ведущий научный сотрудник отделения
химиотерапии.

Ахматова Нэлли Кимовна

доктор медицинских наук, «Научно-
исследовательский институт вакцин и
сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН,
заведующая лабораторией механизмов
регуляции иммунитета.

Ведущая организация:

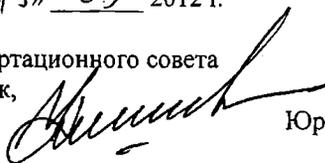
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита состоится «13» 10 2012 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Российской академии медицинских наук. (115478, Москва, Каширское шоссе, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН (115478, г.Москва Каширское шоссе, 24).

Автореферат разослан «13» 09 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



Юрий Владимирович Шишкин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Опухолевый (метастатический) плеврит является частым осложнением многих онкологических заболеваний в стадии диссеминации: в частности, при раке легкого частота возникновения метастатического плеврита достигает 24-50%, при раке молочной железы – до 48%, при раке яичников до 10%. У пациентов с диссеминированным раком желудка, раком толстой кишки, раком поджелудочной железы, меланомой и др. опухолевый плеврит выявляется в 1-6% случаев. [Бычков М.Б., 1999, Bréchet J.M. , 2002]. Метастатический плеврит является клинически значимым осложнением ввиду того, что он может определять течение заболевания, а также в связи с важностью проводимых по поводу данного осложнения лечебных мероприятий, выполняемых зачастую по витальным показаниям [Давыдов М.И., Вышковский Г.Л. и др, 2004]. Лечение метастатических плевритов заключается в осушении плевральной полости, а также в подавлении злокачественного выпота с использованием системной химиотерапии, интраплевральной химиотерапии и склерозирующей терапии, фотодинамической терапии [Давыдов М.И., Вышковский Г.Л. и др, 2004]. Следует отметить, что не существует единых стандартов по лечению метастатических плевритов в рамках таких рекомендательных систем как «Алгоритмы объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований» МЗ РФ, «Практические клинические рекомендации в онкологии» NCCN США, «Минимальные клинические рекомендации ESMO» ЕС. [Тюляндин С.А., и др.2009, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology , 2011].

Отсутствие таких стандартов наряду с клинической значимостью развития опухолевого плеврита на фоне основного заболевания обуславливает актуальность продолжения поисков оптимальных методов лечения метастатических плевритов.

Одним из изучаемых методов терапии метастатических плевритов

является внутриплевральная иммунотерапия, в частности с внутриплевральным введением рекомбинантного интерлейкина-2 (ИЛ-2) и иммунокомпетентных клеток, активированных *ex vivo* в средах с различными цитокинами. История изучения внутриплевральной иммунотерапии насчитывает порядка 20 лет, однако, в процессе исследований авторами использовались различные подходы и режимы введения, что затрудняет внедрение метода в клиническую практику. Нерешенным вопросом на сегодня остаются критерии стандартизации активированных киллеров, в частности, определение оптимального иммунофенотипа цитотоксических клеток, применяемых для такой терапии. Результаты многочисленных исследований, проведенных в течение последних 20 лет, не позволяют на сегодняшний день сделать окончательный вывод о преимуществе использования для данной терапии различных вариантов и комбинаций ИЛ-2 и активированных киллерных клеток.

Таким образом, определение оптимальных режимов локорегиональной иммунотерапии при опухолевых плевритах представляется перспективным направлением исследований.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является сравнительная оценка клинической эффективности внутриплевральной комбинированной иммунотерапии аллогенными активированными НК-клетками с интерлейкином-2 и интерлейкином-2 в монорежиме при лечении метастатических плевритов.

Задачи исследования

1. Изучить фенотип активированных НК-клеток (aNK), генерируемых *ex vivo* из мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) здоровых доноров в присутствии ИЛ-2.
2. Исследовать НК- и цитотоксическую активность aNK.
3. Определить морфологические особенности aNK
4. Оценить клиническую эффективность метода aNK-терапии аллогенными

клетками у больных с метастатическими плевритами различной этиологии.

5. Изучить морфофункциональные характеристики иммунокомпетентных клеток, генерируемых *in vivo* при внутриплевральном введении ИЛ-2, сравнить их с характеристиками аллогенных активированных *ex vivo* клеток.

6. Оценить и сравнить клиническую эффективность применения внутриплеврального введения ИЛ-2 и активированных *ex vivo* клеток.

Научная новизна

В настоящей работе впервые исследована клиническая эффективность и переносимость аллогенных активированных НК-клеток, их иммунофенотипические и морфофункциональные особенности.

Впервые проведено сравнение клинической эффективности локорегионарного применения аллогенных активированных НК-клеток и внутриплевральной иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2.

В работе получены новые данные, характеризующие иммунофенотипические и морфофункциональные особенности как аллогенных активированных НК-клеток, так и аутологичных клеток плеврального экссудата, активированных в процессе внутриплевральной иммунотерапии рекомбинантным интерлейкином-2.

Научно-практическая значимость

Внедрение в клиническую практику метода внутриплевральной иммунотерапии позволит расширить возможности терапии метастатических плевритов.

Основные положения, выносимые на защиту

- При инкубации моноклеарных клеток периферической крови здоровых доноров в среде с рекомбинантным интерлейкином-2 генерируется популяция активированных НК-клеток, характеризующихся высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток линии К-562 *in vitro*. Проведение внутриплевральной иммунотерапии такими клетками при

опухолевых плевритах различной этиологии является высокоэффективным локальным методом лечения опухолевых плевритов.

- При введении в плевральную полость рекомбинантного интерлейкина-2 больным опухолевыми плевритами, из лимфоцитов плеврального экссудата больных генерируются популяции клеток, по морфофункциональным характеристикам и цитотоксичности аналогичные НК-клеткам, генерируемым *in vitro* из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров.

- Проведение внутриплевральной иммунотерапии рекомбинантным ИЛ-2 характеризуется эффективностью, равной эффективности внутриплевральной терапии аллогенными активированными НК-клетками, являясь, таким образом, также высокоэффективным методом лечения опухолевых плевритов.

- Внутриплевральная иммунотерапия опухолевых плевритов с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 является технически простым, доступным методом лечения, характеризующимся также низкой токсичностью, в связи с чем может быть рекомендована для широкого применения в лечебных учреждениях онкологического профиля.

- Внутриплевральная иммунотерапия активированными *ex vivo* аллогенными НК-клетками нуждается в дальнейшем изучении у больных, резистентных к внутриплевральной терапии рекомбинантным интерлейкином-2.

Апробация работы

Апробация диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук аспиранта кафедры онкологии лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России Синельникова Игоря Евгеньевича на тему: «Клиническая эффективность активированных киллеров при метастатических плевритах» состоялась 26 мая 2011 года на совместной научной конференции с участием кафедры онкологии лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России, отделения биотерапии опухолей, отделения химиотерапии, отделения торакальной онкологии, отделения трансплантации

костного мозга и интенсивной химиотерапии, отделения переливания крови НИИКО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, лаборатории комбинированной терапии опухолей, лаборатории клеточного иммунитета НИИ ЭдиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых журналах и тезисы доклада на 8-м Международном симпозиуме по биологической терапии рака (Дрезден, Германия, 2006.).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы с изложением методов исследования, главы результатов, общего обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, иллюстрирована 36 рисунками, 28 таблицами. Список литературы содержит 107 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с целями и задачами работы, исследование объединяло в себе две части – клиническое исследование и экспериментальную работу по изучению морфофункциональных характеристик активированных *ex vivo* и *in vivo* NK-клеток. Клиническое исследование выполнялось на базе отделения биотерпии опухолей НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, экспериментальные исследования на базе лаборатории клеточного иммунитета НИИ ЭдиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

В клиническое исследование было включено 65 больных с метастатическим плевритом, обусловленным следующими нозологиями: - рак молочной железы – 38, рак легкого – 9, рак яичников – 11, рак почки – 6, меланома кожи – 1. Состояние всех больных расценено как средней тяжести.

Диагноз метастатического плеврита был установлен клинически, рентгенологически во всех наблюдениях.

Включение больных в настоящее исследование проводилось в соответствии со следующими критериями включения: возраст от 18 до 70 лет; гистологически подтвержденный диагноз рака молочной железы, яичников, легкого, почки и меланомы кожи, стадия IV, состояние после проведенного стандартного для данного заболевания лечения без эффекта; наличие у больного клинически и рентгенологически подтвержденного метастатического плеврита; статус больного по ECOG 0-3; текущие лабораторные показатели, выполненные в течение 2-х недель до начала ИЛ-2/ЛАК-терапии, должны были находиться в пределах 2 степени токсичности по СТС АЕ v.3.0.

Критериями исключения в настоящее исследование являлись: тяжелые инфекционные заболевания в течение 28 дней, предшествующих началу ИЛ-2/aNK-терапии; серьезные хронические заболевания, требующие постоянного приема препаратов, в том числе кортикостероидов; беременность и лактация; использование каких-либо других противоопухолевых или иммуностимулирующих препаратов в течение 28 дней, предшествующих началу ИЛ-2/aNK-терапии; аутоиммунные заболевания, наличие в анамнезе указаний на аллергические реакции на интерлейкин-2; серьезные сердечно-сосудистые, гематологические, метаболические, неврологические заболевания; наличие метастазов в головном мозге.

До начала внутривезикулярной иммунотерапии все пациенты получали соответствующее комбинированное или комплексное лечение, как правило, хирургическое в комбинации с химио-, гормоно-, иммуно- или радиотерапией. Перед началом иммунотерапии из плевральной полости удалялось 1000-3000 мл серозного, серозно-геморрагического или геморрагического экссудата. Во всех 65 случаях до проведения иммунотерапии выполнялось цитологическое исследование плеврального экссудата.

В клиническом исследовании больные были разделены на две группы:

группу А, получающую внутривнутриплевральную иммунотерапию рекомбинантным ИЛ-2 (Ронколейкином), и группу Б, получающим внутривнутриплевральную иммунотерапию рекомбинантным ИЛ-2 (Ронколейкином) в сочетании с активированными *ex vivo* аллогенными НК-клетками. В группах больные были стратифицированы по подгруппам в соответствии с нозологическими формами первичной опухоли. Больные в группах и подгруппах были сбалансированы по полу и возрасту.

Для проведения иммунотерапии плевральная полость под местной анестезией дренировалась на 14 дней. Для дренирования плевральной полости использовали набор «Плеврокан» (В. Braun, США). Перед введением препарата плевральная полость максимально осушалась. Ронколейкин в группе А вводился в пораженную плевральную полость в дозе 1 млн. МЕ (1 мг) в 20 мл физиологического раствора 1-5 и 8-12 сутки (суммарная доза – 10 млн. МЕ). В группе Б активированные НК-клетки и Ронколейкин вводились в пораженную плевральную полость в дозе 110-150 млн. клеток и 1 млн. МЕ (1 мг) в 1-5 и 8-12 дни (сумм. – 1 млрд. 100 млн.- 1 млрд. 500 млн. и 10 млн. МЕ (10 мг) соответственно.

Контрольные рентгенологические исследования (рентгенографию в 2-х проекциях и/или спиральную компьютерную томографию) органов грудной клетки с целью оценки эффективности лечения проводили после курса иммунотерапии, а также через 1 месяц, и далее в динамике через 6-12 месяцев.

Критериями ответа на терапию являлись:

1. Полный ответ: отсутствие в плевральной полости жидкости по данным рентгенографии или компьютерной томографии органов грудной клетки, выполненной спустя 1 месяц после окончания лечения (удаления Плеврокана и прекращения внутривнутриплеврального введения Ронколейкина.).

2. Частичный ответ: существенное уменьшение количества жидкости (менее 50% от уровня, определяемого до начала лечения) в плевральной полости, включая осумкованную жидкость, по данным рентгенографии или

компьютерной томографии органов грудной клетки, выполненной спустя 1 месяц после окончания лечения (удаления Плеврокана и прекращения внутривидеоплеврального введения Ронколейкина).

Для исследования фенотипов мононуклеарных клеток, полученных из плеврального выпота больных с метастатическим плевритом, активированных *in vivo* интерлейкином-2 в процессе внутривидеоплевральной иммунотерапии, из плеврального экссудата больных с метастатическим плевритом выделяли мононуклеарные клетки перед началом внутривидеоплевральной иммунотерапии ИЛ-2 и на 5-й день иммунотерапии. Мононуклеарные клетки выделяли из стабилизированного гепарином (25 ЕД/мл) плеврального выпота на одноступенчатом градиенте фиколла (Pharmacia, США, плотностью 1.077 г/см³) центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. Мононуклеарные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывали в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

Определение экспрессии поверхностных антигенов мононуклеаров плеврального экссудата проводили при помощи моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов методом проточной цитофлуориметрии. Результаты учитывали методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACScan (Becton Dickinson, США). Определяли уровень экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD8, CD16; активационных антигенов CD25, CD38, HLA-DR; молекул адгезии CD57, CD58. Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5000 событий в гейте. Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WINMDI 2.8.

Цитотоксический тест. Цитотоксическую активность лимфоцитов определяли на NK-чувствительной линии K-562. Опухолевые клетки (1x10⁴ клеток в 1 мл) инкубировались в культуральной среде с мононуклеарными

клетками (в соотношениях клетки-мишени/эфффекторы, равных 1:5; 1:2; 1:1 и 1:0,5) в плоскодонных 96-луночных микропланшетах (фирма Costar, Франция) 18 часов. Затем в лунки добавлялся витальный краситель МТТ (фирма Sigma, США) и по оптической плотности, измеряемой на мультискане MS (фирма LabSystem, Финляндия), рассчитывался процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Для исследования морфофункциональных характеристик и фенотипов клеток, полученных из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, активированных в среде с ИЛ-2, и для использования этих клеток в процессе внутриплевральной иммунотерапии в группе Б, мононуклеарные клетки выделялись из стабилизированной гепарином (25 ед/мл) периферической крови 30 здоровых доноров на одноступенчатом градиенте фикола («Pharmacia», плотностью 1,077 г/см³), центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. Лимфоидные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собрались пипеткой и трехкратно отмывались в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды, клетки осаждались центрифугированием при 200 g. МНК, выделенные из периферической крови ресуспендировали в среде RPMI 1640 (ICN, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ глютамина, стрептомицина с пенициллином по 5000 МЕ/мл в концентрации 1×10^6 в 1 мл среды и добавляли ИЛ-2 (Пролейкин) в концентрации 10000 МЕ/мл. Клетки инкубировали при 4,5% CO₂ и 37°C в течение 2 суток. Полученные активированные НК-клетки дважды отмывались в физиологическом растворе, ресуспендировались в 20 мл 0,9% раствора NaCl и передавались в клинику для внутривенного введения.

Пролейкин и Ронколейкин идентичные рекомбинантные препараты ИЛ-2, различающиеся продуцентами (дрожжи для Ронколейкина и E.Coli для Ронколейкина). Пролейкин имеет более высокую степень очистки (99,9%), чем Ронколейкин (95%). Высокая степень очистки Пролейкина делает его использование в культуральных работах несколько более предпочтительным, поскольку исключает влияния на супрессоры миелоидного ряда компонентов

дрожжей.

Цитотоксический тест и проточная цитометрия проводились по методикам, идентичным методикам, применяемым для изучения лимфоцитов плеврального экссудата.

Электронная микроскопия. Клетки фиксировали в 2%-ном растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере и заключали в смолу эпон-аралгит по стандартной методике. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 (LKB, Швеция) и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100CX (LEOL, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Характеристика активированных НК, полученных из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, активированных в среде с ИЛ-2.

Результатом исследования иммунофенотипа клеток, полученных из мононуклеаров периферической крови и инкубированных в среде с ИЛ-2 являются данные об активной экспрессии этими клетками активационных молекул (CD38), молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR), кроме того, эти клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии молекул адгезии (CD58). Цитологическое изучение позволило установить, что через 2 суток инкубации МНК с ИЛ-2 количество лимфоцитов существенно возрастало и продолжало прогрессивно увеличиваться до 10 суток, при этом отмечалось появление бластных форм. Наиболее ранние изменения наблюдались на 3 сутки инкубации, когда среди мононуклеаров преобладали пиронинофильные лимфоциты. Большое количество бластных форм и пиронинофильных лимфоцитов сохранялось вплоть до 10 суток инкубации с ИЛ-2. Проведенные исследования показали, что полученные в экстракорпоральных условиях аНК обладали достоверно большей НК-активностью по сравнению с интактными МНК. Исследование цитотоксической активности лимфоцитов показало, что при соотношении клетка-мишень эффектор 1:5, МНК лизировали

42% клеток линии К-562, в то время как в аналогичных условиях аNK вызывали гибель 92% опухолевых клеток. В меньших соотношения (1:2 и 1:1) эти различия не столь значимы, хотя активность аNK превышала таковую для МНК. Таким образом, при воздействии ИЛ-2 на МНК крови происходила пролиферация и активация клеток лимфоидного ряда — генерация активированных натуральных киллерных клеток. При этом зрелые лимфоциты подвергались бласттрансформации и морфологически характеризовались как пролимфциты и иммунобласты. В процессе дифференцировки лимфоциты активировались, о чем свидетельствовало накопление РНК в цитоплазме, проявлявшееся в ее яркой пиронинофильной окраске. На активацию лимфоцитов указывали также особенности иммунофенотипа аNK в виде повышенной экспрессии активационных антигенов и молекул адгезии. аNK обладали достоверно более высокой киллерной активностью по отношению к опухолевым клеткам.

2. Характеристика активированных НК, полученных из плеврального выпота больных с метастатическим плевритом.

Имунофенотип лимфоцитов, выделенных из плеврального экссудата в процессе лечения ИЛ-2 (Ронколекином) (после 5-7 внутривлепуральных введений) характеризуется повышенной экспрессией активационных антигенов (CD25, CD40), молекул адгезии (CD57, CD58) и антигенной презентации (HLA-DR), а также натуральных киллеров – CD16 по сравнению с лимфоцитами, полученными из злокачественного выпота до иммунотерапии. При оценке цитотоксической активности было обнаружено, что лимфоциты экссудата до начала лечения лизировали $10\pm 2\%$ аутологичных опухолевых клеток, выделенных из плеврального экссудата, в то время как после внутривлепуральной иммунотерапии их киллерная активность возросла до $53\pm 4\%$. При испытании на НК-чувствительной линии опухолевых клеток К-562 исходная цитотоксичность лимфоцитов составляла $40\pm 5\%$, а стимулированная внутривлепуральным введением Ронколейкина – $90\pm 8\%$.

3. Сравнение иммунофенотипов и цитотоксической активности активированных ИЛ-2 лимфоцитов периферической крови доноров и плеврального экссудата.

При сравнении исходного фенотипа МНК крови и МНК, выделенных из плеврального экссудата, не выявлено достоверных различий. Также не выявлено различий между активированными НК, полученными из периферической крови здоровых доноров и активированными НК, полученными из плеврального экссудата. После проведенного лечения уровень экспрессии маркеров МНК плеврального экссудата аналогичен уровню экспрессии маркеров МНК крови здоровых доноров, инкубированных с ИЛ-2 *in vitro*. Это позволяет делать вывод о сходном фенотипе клеток, генерируемых *in vivo* из МНК плеврального экссудата больных и МНК крови здоровых доноров.

Таким образом, фенотипические характеристики аНК, генерированных из МНК крови доноров и злокачественного выпота больных не имеют значимых различий. Независимо от того использовались ли аллогенные лимфоциты, активированные в присутствии ИЛ-2 *ex vivo* или аутологичные лимфоциты, активированные *in vivo* интерлейкином-2 во внутривнутриплевральной полости пациента, иммунофенотип клеток характеризовался повышенной экспрессией активационных антигенов, молекул адгезии и антигенной презентации, и в целом соответствовал фенотипу активированных натуральных киллеров. В цитотоксическом тесте оба варианта активированных клеток также демонстрировали более высокую, в сравнении с нативными лимфоцитами периферической крови и плеврального экссудата, киллерную активность в отношении опухолевых клеток линии K-562.

4. Результаты внутривнутриплевральной иммунотерапии интерлейкином-2 (Ронколейкином) в группе А.

В данную группу было включено 35 больных с метастатическим экссудативным плевритом: рак легкого - 5 пациентов, рак молочной железы - 22 пациентки, рак почки - 3 пациента, рак яичников - 5 пациенток; из них 7

мужчин и 28 женщин в возрасте от 41 до 75 лет.

По данным цитологических исследований, выполняемых в середине и конце лечения, в середине курса у большинства больных опухолевые клетки отсутствовали или находились в стадии деградации, окруженные активированными лимфоцитами. В конце курса в экссудате опухолевые клетки обнаруживались только у 4-х больных, не ответивших на данное лечение.

Таблица 1. Результаты цитологического исследования плеврального выпота больных в начале лечения, середине курса и при окончании исследования.

	Опухолевые клетки в экссудате перед началом лечения	Опухолевые клетки в экссудате в середине курса	Опухолевые клетки в экссудате при окончании лечения
Рак молочной железы N=22	21	4	2
Рак легкого N=5	4	1	1
Рак почки N=3	3	0	0
Рак яичников N=5	3	1	1

Таблица 1, демонстрирует исчезновение опухолевых клеток в процессе лечения из экссудата большинства больных, у которых опухолевые клетки были цитологически выявлены в экссудате перед началом лечения.

При анализе непосредственной эффективности установлено, что спустя месяц после окончания терапии в группе А зарегистрированы следующие ответы на лечение: у 15 пациентов отмечено полное прекращение экссудации, полный ответ; у 10 пациентов отмечено существенное уменьшение (более 50%) жидкости в плевральной полости, локализация экссудата в осумкованных полостях - частичный ответ; у 10 пациентов отмечено продолжение накопления экссудата в плевральной полости. Общая эффективность внутриплевральной

иммунотерапии ИЛ-2 в группе А составила 71,5%.

4.1. Эффективность внутривлепвальной иммунотерапии ИЛ-2 в группе А, подгруппе больных раком молочной железы.

В данной подгруппе получали лечение 22 пациентки с метастатическим плевритом на фоне рака молочной железы. Все пациентки получали предшествующее лечение: гормонотерапия в анамнезе проводилась 11 пациенткам с рецепторно-положительными опухолями, всем 22 пациенткам проводилась химиотерапия с использованием различных схем, одной пациентке была выполнена безуспешная попытка внутривлепвальной химиотерапии доксорубицином. 9 пациенток получили более одной линии химиотерапии по поводу диссеминированного рака молочной железы с развившимся опухолевым плевритом. Метастатические плевриты у этой группы больных возникали либо как прогрессирование заболевания на фоне проводимого системного лечения, либо присутствовали изначально и прогрессировали на фоне системной химиотерапии или гормонотерапии.

Таблица 2. При анализе эффективности внутривлепвальной иммунотерапии с использованием ИЛ-2 в этой подгруппе больных получены следующие данные:

Клинический эффект	Количество больных
Полный ответ	9 (40,90%)
Частичный ответ	8 (36,36%)
Без эффекта	5 (22,73%)

В таблице 2 представлено, что эффективность лечения в данной подгруппе составила 77,26%.

Суммарная эффективность внутривлепвальной терапии ИЛ-2 при опухолевых плевритах на фоне РМЖ резистентных к системной химиотерапии и гормонотерапии составила, таким образом, 77,26%. Не выявлено корреляции между схемами предшествующего лечения и эффективностью внутривлепвальной иммунотерапии в данной подгруппе больных. Также не

выявлено корреляции между рецепторным статусом первичной опухоли и эффективностью внутривлепвальной терапии.

4.2. Эффективность внутривлепвальной иммунотерапии ИЛ-2 в группе А в подгруппе больных с различными злокачественными опухолями.

В данной подгруппе внутривлепвальная иммунотерапия ИЛ-2 проводилась 13 пациентам с метастатическими плевритами, обусловленными различными опухолями: 5 больным с диссеминированным раком легкого, 5 больным с раком яичников и 3 больным с раком почки. В период, предшествующий проведению внутривлепвальной иммунотерапии, часть больных в этой подгруппе получила системное лечение по поводу основного заболевания: химиотерапию или таргетную терапию в соответствии со стандартами лечения того или иного заболевания. Как и в подгруппе больных раком молочной железы, у пациентов на фоне системного лечения возникал или прогрессировал метастатический плеврит, т.е. в этих случаях локорегионарное введение ИЛ-2 проводилось пациентам с плевритом, резистентным к системной химиотерапии.

Общая эффективность внутривлепвальной иммунотерапии ИЛ-2 в данной подгруппе больных составила 61, 53 %. Не выявлено корреляции между предшествующим лечением и эффективностью внутривлепвальной иммунотерапии ИЛ-2 в данной подгруппе больных.

Таблица 3. Непосредственная эффективность внутривлепвальной иммунотерапии ИЛ-2 в группе А у больных различными злокачественными опухолями.

Клинический эффект	Количество больных
Полный ответ	6 (46,15%)
Частичный ответ	2 (15,38%)
Без эффекта	5 (38,46%)
Общая эффективность	61,53 %

В таблице 3 представлена эффективность внутриплевральной иммунотерапии в данной подгруппе, составившая 61,53 %.

4.3. Отдаленные результаты внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 в группе А.

С целью оценки отдаленных результатов иммунотерапии больным проводилось исследование органов грудной клетки 1 раз в 3 месяца. Оценивалось возникновение рецидивов плеврита. Помимо этого оценивалась общая выживаемость в группе, однако она не являлась критерием оценки отдаленных результатов иммунотерапии. Это связано с тем, что большинство больных после эффективного местного лечения опухолевого плеврита продолжили впоследствии системное лечение по поводу основного заболевания. Наличие последующего системного лечения у большинства больных обуславливает невозможность провести корреляционный анализ эффективности внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 и общей выживаемости. Поскольку внутриплевральная иммунотерапия является по своей сути местным лечением, направленным на одно из осложнений метастатической болезни, ее влияние на выживаемость является косвенным: эффективное лечение опухолевого плеврита улучшает общее состояние больного, увеличивает непосредственную выживаемость больных и обуславливает возможность продолжения системного лечения больного.

Таблица 4. Отдаленные результаты внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 в группе А.

Рецидив плеврита после иммунотерапии.	8 (23%)
Умерли от прогрессирования заболевания	11 (31,43%)
Выживаемость более 24 месяцев	24 (68,57%)

В таблице 4 представлены отдаленные результаты внутриплевральной иммунотерапии, демонстрирующие низкую частоту рецидивов плеврита среди

проходивших внутриплевральную иммунотерапию ИЛ-2. Период наблюдения за пациентами в группе А составил 2 года. В течение этого периода рецидив опухолевого плеврита выявлен у 8 пациентов. 11 пациентов умерли от прогрессирования заболевания. 24 пациента живы спустя 2 года после завершения внутриплевральной терапии, без рецидива плеврита.

5. Результаты внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 и активированными *ex vivo* НК-клетками в группе Б.

В данной группе 30 больных с метастатическим плевритом получали внутриплевральную иммунотерапию аллогенными донорскими НК-клетками, активированными *ex vivo* в среде с интерлейкином-2. Пациенты в группе распределились следующим образом: пациентки с раком молочной железы - 16, с раком яичников – 6, с немелкоклеточным раком легкого - 4, рак почки-3, меланома кожи-1; из них 4 мужчин и 26 женщин в возрасте от 42 до 73 лет.

До начала ИЛ-2/аллоген. аНК внутриплевральной терапии все пациенты, за исключением трех, получали соответствующее комбинированное лечение (химиотерапия, гормонотерапия, хирургическое, лучевая терапия). Ранее двум пациентам проводилась внутриплевральная химиотерапия по поводу плеврита без эффекта. В исследование были включены 27 пациентов с односторонним плевритом и 3 пациента с двусторонним метастатическим плевритом, в последних случаях, учитывая малое количество жидкости во второй полости у двух пациентов, дренирование плевральной полости проводили только с одной стороны, а у одного пациента оно было двусторонним.

Цитологическое исследование проводилось у всех больных с плевритом до начала внутриплевральной иммунотерапии, а также в середине – на 8 сутки, и в конце лечения – на 15-й день. При цитологическом исследовании установлено, что в плевральном выпоте до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток. В конце курса у пациентов, ответивших на лечение, в экссудате опухолевые клетки не определялись.

Таблица 5. Результаты цитологического исследования плеврального выпота до начала лечения, в середине курса и при окончании лечения в группе Б.

	Опухолевые клетки в экссудате перед началом лечения	Опухолевые клетки в экссудате в середине курса	Опухолевые клетки в экссудате при окончании лечения
Рак молочной железы N=16	14	2	0
Рак легкого N=4	4	1	1
Рак почки N=3	2	0	0
Рак яичников N=6	6	1	0
Меланома кожи	1	1	1

При анализе непосредственной эффективности лечения в группе Б зарегистрированы следующие ответы на лечение: у 15 пациентов отмечено полное прекращение экссудации, полный ответ. У 10 пациентов отмечено существенное уменьшение (более 50%) жидкости в плевральной полости, локализация экссудата в осумкованных полостях, частичный ответ. У 5 пациентов отмечено продолжение накопления экссудата в плевральной полости. Общая эффективность терапии в этой группе составила 83,33%.

Таблица 6: непосредственная эффективность внутривнутриплевральной иммунотерапии активированными ex vivo аллогенными НК-клетками и ИЛ-2:

Клинический эффект	Количество больных
Полный ответ	15 (50,0%)
Частичный ответ	10 (33,33%)
Без эффекта	5 (16,66%)

В таблице 6 представлена общая эффективность внутривнутриплевральной

иммунотерапии активированными ex vivo аллогенными НК-клетками в группе В, составляющая 83,33 %.

5.1. Результаты внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 и активированными ex vivo НК-клетками в группе Б, подгруппе больных раком молочной железы.

В данной подгруппе получали лечение 16 пациенток с метастатическим плевритом на фоне рака молочной железы. Из 16 пациенток 11 в анамнезе получали гормонотерапию, 14-ти проводилась системная химиотерапия по поводу диссеминированного рака молочной железы с развившимся метастатическим плевритом, 8 пациенток получили несколько линий полихимиотерапии. Одной пациентке проводилась внутриплевральная химиотерапия тиофосфамидом, без эффекта. Две пациентки не получали системного лечения по поводу диссеминированного РМЖ, внутриплевральная ЛАК-терапия им была проведена в качестве местного лечения, предшествующего системной химиотерапии. При анализе эффективности терапии в подгруппе больных раком молочной железы не выявлено корреляции между предшествующим лечением и эффективностью внутриплевральной терапии активированными ex vivo аллогенными НК-клетками. Также не выявлено связи между эффективностью лечения и рецепторным статусом у больных. Общая эффективность данного вида терапии в этой подгруппе больных составила 87,5%.

Таблица 7: эффективность внутриплевральной иммунотерапии активированными ex vivo аллогенными НК_клетками в подгруппе больных диссеминированным раком молочной железы.

Клинический эффект	Количество больных
Полный ответ	6 (37,5%)
Частичный ответ	8 (50,0%)
Без эффекта	2 (12,5%)

В таблице 7 представлено, что общая эффективность внутриплевральной

иммунотерапии активированными аллогенными НК-клетками в данной подгруппе составила 87,5 %.

5.2. Результаты внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 и активированными *ex vivo* НК-клетками в группе Б, подгруппе больных прочими злокачественными новообразованиями.

В данной подгруппе внутриплевральная иммунотерапия ИЛ-2 проводилась 14 пациентам с метастатическими плевритами, обусловленными различными опухолями: 4 больным с диссеминированным немелкоклеточным раком легкого, 6 больным с раком яичников, 3 больным с раком почки и 1 больному с диссеминированной меланомой кожи. В период, предшествующий проведению внутриплевральной иммунотерапии, 13 больных в этой подгруппе получали системное лечение по поводу основного заболевания, сопровождавшегося развитием опухолевого плеврита, на фоне которой отмечено прогрессирование плеврита. Одна пациентка с диссеминированным раком яичников не получала предшествующего лечения по поводу метастатической болезни.

При анализе эффективности у этих больных внутриплевральной иммунотерапии активированными *ex vivo* аллогенными НК-клетками, не выявлено корреляции между предшествующим лечением и эффективностью внутриплевральной иммунотерапии. Общая эффективность данного вида терапии в этой подгруппе составила 78,57%.

Таблица 8: Непосредственная эффективность внутриплевральной иммунотерапии активированными *ex vivo* НК-клетками в группе Б, подгруппе больных с различными злокачественными новообразованиями.

Клинический эффект	Количество больных
Полный ответ	9 (64,29%)
Частичный ответ	2 (14, 28%)
Без эффекта	3 (21,43%)
Общая эффективность	78,57 %

В таблице 8 представлена эффективность внутриплевральной иммунотерапии активированными NK-клетками. Общая эффективность составила 78,57%.

5.3. Отдаленные результаты внутриплевральной иммунотерапии ИЛ-2 и активированными ex vivo NK-клетками в группе Б.

С целью оценки отдаленных результатов иммунотерапии больным проводилось исследование органов грудной клетки 1 раз в 3 месяца. Оценивалось возникновение рецидивов плеврита. Помимо этого оценивалась общая выживаемость в группе, однако, как и в группе А, она не являлась критерием оценки отдаленных результатов в связи с тем, что большинство больных после внутриплевральной иммунотерапии по поводу опухолевого плеврита получали в последующем системное лечение. Как и в группе А, эффект от успешного лечения опухолевого плеврита и его влияние на выживаемость может быть косвенным.

Период наблюдения за пациентами в группе Б, также, как в группе А, составил 2 года. В течение этого периода рецидив опухолевого плеврита выявлен у 4 пациентов. 7 пациентов умерли от прогрессирования заболевания. 23 пациента живы спустя 2 года после завершения внутриплевральной терапии, без рецидива плеврита.

Таблица 9: Отдаленные результаты внутриплевральной иммунотерапии активированными ex vivo NK-клетками в группе Б.

Рецидив плеврита после иммунотерапии	4 (13,3%)
Умерли от прогрессирования заболевания	7 (23,33%)
Выживаемость более 24 месяцев	23 (76,67%)

6. Сравнение результатов внутриплевральной иммунотерапии в группах А и Б.

При сравнении эффективности лечения в группах внутриплевральной иммунотерапии с использованием активированных ex vivo НК-клеток и интерлейкина-2 не выявлено достоверных различий в частоте объективных реакций.

Таблица 10. Сравнение эффективности лечения в группах А и Б.

	А (ИЛ-2) (N=35)	Б (ИЛ-2 + aNK) (N=30)	P
Нет ответа, n (%)	10 (28,5)	5 (16,7)	0,52
Частичный ответ	10 (28,6)	10 (33,3)	0,9
Полный ответ	15 (42,9)	15 (50,0)	0,57

При анализе эффективности в подгруппах больных раком молочной железы и прочими злокачественными опухолями также не выявлено достоверных различий в частоте объективных реакций и продолжительности ответов. Медиана продолжительности ответа не достигнута в обеих группах. Медиана выживаемости в группах не оценивалась, поскольку не имеет отношения к эффективности локального лечения в связи с тем, что пациенты в дальнейшем получали системное лечение по поводу основного заболевания.

Таблица 11: сравнение эффективности внутриплевральной иммунотерапии в подгруппах больных раком молочной железы в группах А и Б.

	А (ИЛ-2) (N=22)	Б (ИЛ-2 + aNK) (N=16)	P
Полный ответ	9 (40,90%)	6 (37,5%)	0.74
Частичный ответ	8 (36,36%)	8 (50,0%)	0.52
Без эффекта	5 (22,74%)	2 (12,5%)	0.67
Общая эффективность	77.26%	87.5%	0.67

Таблица 12: сравнение эффективности внутривлепвальной иммунотерапии в подгруппах больных прочими злокачественными новообразованиями в группах А и Б.

	А (ИЛ-2) (N=13)	Б (ИЛ-2 + aNK) (N=14)	P
Полный ответ	6 (46,15%)	9 (64,29%)	0.45
Частичный ответ	2 (15,38%)	2 (14,28%)	1
Без эффекта	5 (38,46%)	3 (21,43%)	0.42
Общая эффективность	61.53%	78.57%	0.42

7. Токсичность внутривлепвальной иммунотерапии.

При сравнении побочных эффектов, наблюдаемых при химиотерапии и иммунотерапии больных с опухолевыми плевритами, последняя, в отличие от химиотерапии, вызывает главным образом гипертермию. 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 отмечалось. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости иммунотерапии, требующие отмены лечения или снижения доз ИЛ-2/aNK-терапии, не были зарегистрированы. Практически у всех пациентов проведение внутривлепвальной иммунотерапии сопровождалось повышением температуры тела выше 38°C. Как правило, реакция гипертермии у больных появлялась уже после первого введения. Повышение температуры наступало обычно через 3-4 часа после введения и наблюдалось в течение нескольких часов. Реакция купировалась приемом парацетамола.

Таким образом, внутривлепвальная иммунотерапия практически не вызывает у больных побочных эффектов, за исключением явлений

гипертермии, которая купируется антипиретиками.

ВЫВОДЫ

1. Активация рекомбинатным интерлейкином-2 (Ронколейкином) *ex vivo* мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров, *in vivo* интерлейкином-2 (Ронколейкином) лимфоцитов плеврального выпота больных с метастатическим плевритом приводит к формированию популяций активированных НК-клеток со сходным фенотипом морфофункциональных характеристик и цитотоксичностью.

2. Активированные НК-клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии молекул адгезии CD58 и активационных антигенов CD38 и CD25.

3. Внутриплевральная терапия активированными как *ex vivo*, так и *in vivo* НК-клетками характеризуется высокой эффективностью и низкой токсичностью при лечении метастатических плевритов различной опухолевой этиологии, в том числе и резистентных к системной химиотерапии.

4. Внутриплевральная иммунотерапия активированными *ex vivo* НК-клетками не продемонстрировала явных преимуществ перед внутриплевральной терапией рекомбинатным ИЛ-2 в настоящем исследовании в общей популяции больных. Однако, было отмечено, что терапия аллогенными НК-клетками эффективна у больных, в экссудате которых перед началом лечения не определялось лимфоцитов. Внутриплевральная иммунотерапия активированными *ex vivo* НК-клетками может применяться при отсутствии лимфоцитов в злокачественном выпоте и обусловленной этим неэффективности внутриплевральной терапии рекомбинатным ИЛ-2 (Ронколейкином) и нуждается в дальнейшем изучении.

5. Внутриплевральная иммунотерапия интерлейкином-2 является технически простым и доступным методом лечения и может быть рекомендована для широкого применения в лечебно-профилактических учреждениях онкологического профиля.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах рекомендованных Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки России:

1. Демидов, Л.В. Проблемы клинического применения ИЛ-2/ЛАК-терапии / Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Синельников И.Е., Шубина И.Ж., Черемушкин Е.А., Виршке Э.Р., Петенко Н.Н., Огородникова Е.В., Арустамян Л.Ю., Киселевский М.В. // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. - №4. – С.29-38.
2. Титов, К.С. Возможности внутриплевральной иммунотерапии у больных с метастатическими плевритами / Титов К.С., Киселевский М.В., Демидов Л.В., Шубина И.Ж., Михайлова И.Н., Синельников И.Е., Родионова Л.М. // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. №2. – С.65-66.
3. Титов, К.С. Внутриплевральная иммунотерапия метастатических плевритов у больных раком молочной железы / Титов К.С., Демидов Л.В., Киселевский М.В., Михайлова И.Н., Шубина И.Ж., Грицай А.Н., Синельников И.Е., Родионова Л.М., // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2009. - №3-4. – С.34-38.
4. Титов, К.С. Использование рекомбинантного интерлейкина-2 при внутриплевральном лечении опухолевых плевритов / Титов К.С., Киселевский М.В., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Шубина И.Ж., Родионова Л.М., Синельников И.Е., Тополь К.Ю., Грицай А.Н.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. - №11. – С.547-549.
5. Титов, К.С. Внутриплевральная иммунотерапия интерлейкином-2 у больных с метастатическим плевритом. / Титов К.С., Демидов Л.В., Киселевский М.В., Шубина И.Ж., Михайлова И.Н., Родионова Л.М., Тополь К.Ю., Синельников И.Е., Грицай А.Н.// Российский онкологический журнал. – 2010. - №3. – С.20-24.

В иностранных журналах:

Михайлова, И.Н. Оценка иммунного статуса у больных немелкоклеточным раком легкого на фоне проведения адьювантной иммунотерапии ИЛ-2/ЛАК-клетками./ Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Полоцкий Б.Е., Лактионов К.К., Казанова Г.В., Короткова О.В., Васильев А.В., Синельников И.Е., Петенко Н.Н., Бойко Н.И., Огородникова Е.В., Арустамян Л.Ю., Киселевский М.В. // Онкология и радиология Казахстана. – 2005. - №2(11). – С.61-67.

Тезисы конференций, конгрессов и симпозиумов

Mikhailova, IN. Locoregional LAK therapy of cancer./ Mikhailova IN, Titov KS, Sinelnikov IE, Petenko NN, Cheremushkin EA, Shubina IZ, Ogorodnikova EV, Vishnyakova, Kiselevskiy MV, Demidov L.V.// 8th International Symposium Biological Therapy of Cancer from Disease to Targeted Therapy. Dresden, Germany. – 2006. - June 21-24.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mikhailova', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

Подписано в печать . Формат 60×84/16.
Бумага офисная «SvetoCopy». Тираж 100 экз. Заказ № 737

Отпечатано на участке множительной техники
ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН
115478, г. Москва, Каширское ш., 24

12 - 19833

794



2012350081