

На правах рукописи

ТИТОВ КОНСТАНТИН СЕРГЕЕВИЧ

**ВНУТРИПОЛОСТНАЯ БИОТЕРАПИЯ
ОПУХОЛЕВЫХ СЕРОЗИТОВ**

14.01.12 — онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва — 2015

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»
(директор — академик РАН, профессор Давыдов Михаил Иванович)**

Научный консультант:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Киселевский Михаил Валентинович

Официальные оппоненты:

Пикин Олег Валентинович, доктор медицинских наук, руководитель отделения торакальной хирургии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Поликарпова Светлана Борисовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии лечебного факультета Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ахматова Нелли Кимовна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

Ведущая организация: Федеральное государственное научное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения РФ.

Защита состоится «.....».....2015г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» (115478, г. Москва Каширское шоссе, 24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....».....2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Шишкин Ю.В.

АКТУАЛЬНОСТЬ И РАЗРАБОТАННОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опухолевые серозиты (плевриты, асциты и перикардиты) встречаются примерно у 50% больных с диссеминированными формами злокачественных новообразований и являются одной из основных причин их летальности. Наиболее часто они возникают у больных раком легкого, раком молочной железы, раком желудка и раком яичников. Качество жизни у данных больных резко снижается из-за наличия симптомов дыхательной недостаточности, компрессии внутренних органов и нарушения гомеостаза, а при выполнении с целью удаления экссудата частых пункций без эффективного лечения достаточно быстро приводят к декомпенсации организма и гибели больных в течение нескольких месяцев (Бычков М.Б. с соавт., 2010; Сельчук В.Ю. с соавт., 2011; Smyth M.J. et al., 2015).

При первичной низкой чувствительности злокачественной опухоли к лекарственному лечению или при развитии в процессе системной терапии резистентности к цитостатикам, лечение как правило начинают с внутрисплетного введения склерозантов (цисплатин, блеомицин, тальк и др.), которые в виду своей не специфичности на опухоль не всегда вызывают необходимый клинический эффект и нередко тяжело переносятся больными (Филоненко Д.В. с соавт., 2013; Тюляндина А.С. и соавт., 2013; Markman M. et al., 2005, Базин И.С. с соавт., 2010; Kollmannsberger C. et al., 2014; Taylor A.M. et al., 2015). Ранее полученные зарубежными исследователями предварительные данные позволяют предполагать, что ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия не уступает по своей эффективности стандартным методам лечения опухолевых серозитов и обладает при этом низкой токсичностью (Sutlu T. et al., 2010; Kiselevsky M.V., 2012). Однако, не ясным остается оптимальная доза цитокинов и оценка эффективности внутрисплетной биотерапии, а также нет сравнительных исследований по изучению эффективности и переносимости клеточной и цитокиновой иммунотерапии.

Таким образом, несмотря на предлагаемые подходы в зарубежной и отечественной онкологической практике на сегодняшний день не существует единого подхода в лечении больных с опухолевыми серозитами,

резистентными к системной лекарственной терапии. Одним из перспективных и многообещающих путей решения этой важной проблемы в онкологии, является разработка и внедрение в клиническую практику современных и эффективных методов внутрисполостной биотерапии злокачественных выпотов, которые характеризуются безопасностью и способны оказывать эффективное противоопухолевое действие за счет локальной активации клеток-эффекторов врожденного иммунитета, что и позволяет считать данное исследование своевременным и актуальным.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка, оценка клинической эффективности и переносимости методов внутрисполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами, резистентных к системной противоопухолевой терапии.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Определить показания к внутрисполостной биотерапии, с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) и лимфокин-активированных киллеров (ЛАК), для больных с опухолевыми серозитами.
2. Оценить морфо-функциональные и иммунофенотипические характеристики аутологичных и аллогенных лимфокин активированных киллеров при проведении внутрисполостной биотерапии.
3. Изучить содержание супрессорных Т-регуляторных клеток в популяции аутологичных и аллогенных ЛАК.
4. Изучить динамику содержания опухолевых клеток и активированных лимфоцитов при цитологическом исследовании экссудата в процессе внутрисполостной биотерапии.
5. Разработать режимы внутрисполостной биотерапии с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкина) и в его комбинации с аллогенными ЛАК-клетками у пациентов с опухолевыми плевритами, асцитами и перикардитами.

6. Оценить клиническую эффективность внутриполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами.
7. Определить переносимость больными методов внутриполостной биотерапии.
8. Определить наиболее оптимальный и доступный для широкого клинического применения метод внутриполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые в России и в мире на репрезентативной выборке (n=203) проведено сравнительное исследование по изучению клинической эффективности и переносимости методов внутриполостной иммунотерапии опухолевых серозитов (плевритов, перикардитов и асцитов) с использованием малых доз отечественного препарата рекомбинантного ИЛ-2 человека (Ронколейкин) в комбинации с аутологичными или с аллогенными ЛАК-клетками, а также и в монорежиме с ИЛ-2.

Разработаны новые подходы, обеспечивающие оптимальные условия генерации *ex vivo* ЛАК-клеток из экссудата плеврального выпота и периферической крови здоровых доноров. Получены новые данные, характеризующие особенности морфологии, иммунофенотипа и функциональной активности активированных лимфоцитов в отношении опухолевых и нормальных клеток.

Впервые установлено, что предложенные варианты внутриполостной биотерапии высокоэффективны и не токсичны у больных, ранее получавших системное противоопухолевое лечение. Предложены также новые оптимальные режимы введения ИЛ-2 и ЛАК-клеток для лечения опухолевых серозитов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Теоретическая значимость работы заключается в том, что на репрезентативном материале из ведущего онкологического учреждения России получены данные, касающиеся иммунологических, морфологических и клинических результатов внутриполостной биотерапии больных с

опухолевыми серозитами, резистентных с системной лекарственной терапии. Полученные в исследовании данные имеют большое практическое значение, поскольку разработан, апробирован и рекомендован для внедрения в онкологическую практику России новый высокоэффективный и не токсичный метод внутриполостного лечения больных с опухолевыми серозитами с использованием отечественного рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) и ЛАК-клеток, расширяющий возможности современного противоопухолевого лечения больных с диссеминированными формами злокачественных новообразований, резистентных к системной терапии. Также разработаны методы генерации *ex vivo* ЛАК-клеток из злокачественного экссудата и периферической крови здоровых доноров.

Предложенные методы лечения нашли отражение в практических рекомендациях, они могут успешно применяться в клинической онкологии у пациентов с опухолевыми серозитами в качестве терапии первой линии при низкочувствительных к цитостатикам формам злокачественных новообразований, а также у больных с ECOG 1-3 или у пациентов с исчерпанными возможностями стандартного лекарственного лечения при прогрессировании опухолевого процесса.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 203 больных с морфологически подтвержденными опухолевыми серозитами (плевриты, асциты и перикардиты), в основном имевшие резистентность или противопоказания к системной противоопухолевой терапии и получивших различные методы внутриполостной биотерапии с 2003 по 2013 годы. Из них рак молочной железы встречался у 64 пациенток (31,5%), рак яичников — 62 (30,5%), немелкоклеточный рак легкого 34 (16,8%), рак желудка — 23 (11,4%), рак почки — 10 (4,9%), рак толстой кишки — 5 (2,5%), мезотелиома плевры 3 (1,5%) и рак поджелудочной железы — 2 (0,9%). Пациенты были разделены на 3 группы по локализации серозита, на плевриты — 93 (45,8%), асциты — 72 (35,5%) и перикардиты — 38 (18,7%), далее пациенты в свою очередь

были разделены на подгруппы в зависимости от метода внутрисполостной биотерапии.

Получение ЛАК-клеток. Опухолевый экссудат больного или лейкомассу, полученную из периферической крови здоровых доноров, центрифугированием (1000 об./мин, в течение 20 мин) разделяли на клеточную и плазменную части. Из клеточной фракции выделяли МЛ и опухолевые клетки в двухступенчатом градиенте плотности Ficoll-Nustopaque (фирма «Sigma», USA), далее путем центрифугирования опухолевые клетки и МЛ разделяли, затем собирали в разные пробирки и дважды отмывали средой 199. Из МЛ генерировали ЛАК, а опухолевые клетки использовали для оценки цитотоксической (противоопухолевой) активности ЛАК. Для получения ЛАК МЛ помещали в культуральные пластиковые флаконы с питательной средой RPMI-1640. Концентрация МЛ составляла 2 млн/мл. В питательную среду добавляли рекомбинантный интерлейкин-2 человека (ИЛ-2) («Ронколейкин», ООО «Биотех», Россия) в концентрации 1000 МЕ/мл. МЛ инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂ в течение 72 часов. По окончании инкубации полученные ЛАК дважды отмывали от среды и ресуспендировали в 20 мл физиологического раствора и передавали в клинику для внутрисполостного введения больному.

Морфологическое исследование. Взвесь МЛ, выделенных из опухолевых экссудатов, а также МЛ, полученных из периферической крови здоровых доноров наносили на предметное стекло, фиксировали в растворе Май-Грюнвальда, после чего окрашивали эозин-азуром по Романовскому-Гимза, метиловым зеленым-пиронином по Браше с контрольной обработкой РНК-азой, реактивом Шиффа по Шабадашу с контролем амилазой на гликоген и гликозаминогликаны. В окрашенных по Браше мазках подсчитывалось процентное содержание выявляемых клеток. Световую микроскопию и фотографирование клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 («Carl Zeiss», Германия).

Функциональная и цитотоксическая активность. Оценку функциональной активности МЛ и ЛАК производили с помощью

иммуноферментного анализа ELISA (тест-системы для определения цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- γ («BioSource»). Цитотоксическую (киллерную) активность лимфоцитов изучали в МТТ-колориметрическом тесте с последующим вычислением индекса цитотоксической активности. Результат оценивали спектрометрически по оптической плотности, измеряемой при длине волны 540 нм на мультискане Multiscan MS («Labsystem», Финляндия) и рассчитывали процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности). Использовались стандартные соотношения клетка-мишень/клетки-эффекторы 1:5; 1:2 и 1:1.

Иммунофенотип лимфоцитов изучали методом проточной цитометрии на цитофлюориметре BD Canto II (Becton Dickinson, USA) с использованием моноклональных антител Caltag Laboratories, США, Beckman Coulter, США и Miltenyi Biotec Inc., Германия к антигенам CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD38, CD56, CD57, CD58, HLA-DR, Foxp3, меченных флуорохромами. Популяцию лимфоцитов идентифицировали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали не менее 5000 клеток. Статистическая обработка материала проведена с использованием программного пакета WIN MDI.

Методика проведения внутриполостной биотерапии. Для проведения внутриполостной биотерапии пораженную серозную полость дренировали под местной анестезией эластичным катетером «Плеврокан» по стандартным методикам на срок 14 дней при опухолевых плевритах, 7 дней при перикардитах и на 21 день при асцитах. Серозная полость с первого дня лечения и далее через день максимально осушалась, после чего в нее через катетер вводили биопрепараты по схеме: Ронколейкин («Биотех», Россия) по 1 млн. МЕ (1 мг), разведенный на 20 мл физиологического раствора в монорежиме или в комбинации с ЛАК-клетками по 100-150 млн. клеток, также разведенных на 20 мл физиологического раствора в 1-5, 8-10 дни при плевритах, 1-5 дни при перикардитах и 1-5, 8-12, 15-19 дни при асцитах. Ронколейкин и ЛАК-клетки вводили в пораженную серозную полость поочередно медленно. При обнаружении осумкованного экссудата проводили дополнительную пункцию и после его удаления также вводили в

полость вышеуказанные биопрепараты. На цитологическое исследование экссудат отправляли до начала курса биотерапии, в середине курса и после его окончания. После завершения внутриполостной биотерапии «Плеврокан» удаляли с наложением герметичной асептической повязки. Контрольное исследование проводили непосредственно после окончания курса, через 1 месяц и далее в динамике каждые 3 месяца, в течение жизни больного. Критериями оценки эффективности внутриполостной биотерапии при опухолевых серозитах являлся объективный ответ (ОО), оцениваемый через 1 месяц после окончания данного лечения: полный эффект (ПЭ) — отсутствие экссудата в серозной полости, частичный эффект (ЧЭ) — небольшое количество экссудата, не требующее его удаления, а также уменьшения клинических проявлений опухолевого серозита. Объективный ответ (ОО) — суммация полного и частичного ответов. В случаях, не соответствующих этим двум положениям, результат расценивали как прогрессирование опухолевого процесса в серозной полости. Также дополнительным критерием эффективности лечения являлась оценка продолжительности объективного ответа после внутриполостной биотерапии. Общая медиана выживаемости у больных не оценивалась, поскольку она не имела отношения к эффективности локального лечения в связи с тем, что некоторые пациенты в дальнейшем получали системную лекарственную терапию по поводу основного заболевания.

Статистические методы. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Statistica 6.0» (StartSoft Inc) с расчетом средних арифметических значений, критериев Вилкоксона, регрессионного и корреляционный анализа с применением рангового критерия Спирмена. Расчеты проведены с помощью модулей «Множественная регрессия» и «Непараметрическая статистика», достоверность различий оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

Внутриполостная ИЛ-2/ЛАК- и ИЛ-2-биотерапия позволяет оптимизировать лечение больных с опухолевыми плевритами, асцитами и

перикардитами, резистентных к системной терапии, также ее проведение возможно пациентам при наличии у них противопоказаний к цитостатическому лечению. При проведении внутриполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами могут эффективно и без проявления токсичности использоваться малые дозы рекомбинантного ИЛ-2 (разовая доза — 1 млн. МЕ).

ЛАК-клетки по своему иммунофенотипу (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+, CD57+, CD58+, CD25+, CD38+ и HLA-DR) и морфофункциональным характеристикам соответствуют активированным лимфоцитам, обладающим высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток пациента и отсутствием ее к нормальным клеткам.

По результатам динамического цитологического исследования экссудата, проводимого всем больным с опухолевыми серозитами в процессе внутриполостной биотерапии, в большинстве случаев отмечается дегенерация опухолевых клеток с их последующим лизисом, что коррелирует с наступлением объективного ответа.

Внутриполостная клеточная и/или цитокиновая биотерапия у больных с опухолевыми серозитами характеризуется высокой клинической эффективностью и позволяет достичь длительности объективного ответа, поэтому данное лечение следует начинать с ИЛ-2-биотерапии в монорежиме, а при ее неэффективности лечение может быть дополнено введением в серозную полость аллогенных ЛАК-клеток. Основным побочным эффектом внутриполостной ИЛ-2/ЛАК- и ИЛ-2-биотерапии является гриппоподобный синдром разной степени выраженности. Гематологической и других видов токсичности у пациентов на фоне данного лечения отмечено не было.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Репрезентативная выборка пациентов, достаточная для анализа оценки клинической эффективности и переносимости методов внутриполостной биотерапии, детальный анализ исходов данного лечения наряду с применением адекватных методов статистической обработки данных

свидетельствуют о достоверности полученных результатов. Разработанные в исследовании методы лечения у больных с опухолевыми серозитами апробированы и внедрены в практику отделения биотерапии опухолей ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

Основные положения диссертации были представлены на научных съездах и конференциях в России и за рубежом в 2006-2014 гг.

Апробация диссертации состоялась 14 апреля 2015 года на совместной научной конференции с участием хирургических отделений: торакального торако-абдоминального отдела, отделения опухолей молочных желез, отделения опухолей печени и поджелудочной железы, отделения опухолей женской репродуктивной системы, отделения биотерапии опухолей; отделения химиотерапии, отделения клинической фармакологии и химиотерапии и научно-консультативного отделения НИИ КО ФГБНУ «РОНЦ им.Н.Н.Блохина»; лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории иммунофармакологии и лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», кафедры онкологии и лучевой терапии лечебного факультета и кафедры онкологии факультета дополнительного последиplomного образования ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ.

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 37 печатных работ, в том числе 22 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ; 8 глав в монографиях и 4 тезиса докладов.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики больных, описания материалов и методов, 3 глав собственных результатов, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, включающего 24 отечественных и 224 зарубежных

источников. Материалы диссертации изложены на 250 страницах машинописного текста и иллюстрированы 70 таблицами и 59 рисунками.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, касающейся проблемы системного и внутриполостного лечения больных с опухолевыми плевритами, асцитами и перикардитами. Организованы и проведены экспериментальные методы исследования взаимодействия опухолевых клеток и иммунокомпетентных клеток периферической крови и экссудата больных. Автором выполнены больным дренирования серозных полостей и проведена внутриполостная биотерапия по поводу опухолевых серозитов. Разработан дизайн исследования и кодификатор базы данных. Статистическая обработка данных, интерпретация полученных результатов и оформление диссертации произведены автором.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12- онкология, конкретно — пункту 6.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В исследование включены 203 больных с морфологически подтвержденными опухолевыми серозитами (плевриты, асциты и перикардиты), в основном имеющие резистентность или противопоказания к системной противоопухолевой терапии и получивших различные методы внутриполостной биотерапии с 2003 по 2013 годы. Включение больных в данное проспективное исследование проводилось на основании научного протокола «Адоптивная иммунотерапия у больных с экссудативными формами рака», утвержденного на Ученом Совете НИИ Клинической онкологии «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН в 2003 году и подписанного

пациентами добровольного информированного согласия в соответствии с установленными критериями включения.

В исследование вошли 128 (63%) женщин и 75 (37%) мужчин. Из них 30 (14,7%) — до 45 лет, 112 (55,2%) — от 45 до 59 лет и 61 (30,1%) — 60 лет и старше. Рак молочной железы встречался у 64 пациенток (31,5%), рак яичников — 62 (30,5%), немелкоклеточный рак легкого 34 (16,8%), рак желудка — 23 (11,4%), рак почки — 10 (4,9%), рак толстой кишки — 5 (2,5%), мезотелиома плевры 3 (1,5%) и рак поджелудочной железы — 2 (0,9%)

До внутриполостной биотерапии в 193 (95,1%) случаях проводилось противоопухолевое лечение: хирургическое 134 (66,0%), лучевая терапия — 52 (25,6%) и системное лекарственное лечение: полихимиотерапия — 181 (89,2%), таргетная терапия — 18 (8,9%), гормонотерапия — 47 (23,1%), иммунотерапия — 7 (3,4%), а также внутривидеальное введение цитостатиков было у 5 (2,4%) больных. Опухолевый серозит во всех случаях был цитологически верифицирован. При цитологическом исследовании удаленного экссудата аденокарцинома различных вариантов встречалась у 178 пациентов (87,7%), плоскоклеточный рак — 20 (9,9%), железисто-плоскоклеточный рак — 2 (0,9%), мезотелиома — 3 (1,5%) пациентов. Диагноз мезотелиомы плевры у всех 3-х пациентов был подтвержден иммуногистохимическим исследованием.

Опухолевый серозит, как вариант диссеминации, во всех 203 наблюдениях был установлен клинико-морфологически, а также с помощью инструментальных методов диагностики (рентгенография, КТ, МРТ, УЗИ, эхокардиография). У больных преобладал серозный экссудат, который встречался в 52,7% случаях, в 44,8% случаев отмечалась умеренная степень накопления (0,5-1,0 л/сут) злокачественного выпота.

Все больные получили по 1 курсу внутриполостной биотерапии. Эффективность лечения оценивалась клинически, лучевыми методами диагностики (по количеству экссудата в серозной полости), а также цитологическим методом по изменению его клеточного состава (исчезновению опухолевых клеток и увеличению числа активированных лимфоидных клеток).

Пациенты были разделены на 3 группы по локализации серозита: плеврит (93 (45,8%)), асцит (72 (35,5%)) и перикардит (38(18,7%)), далее пациенты в свою очередь были разделены на подгруппы в зависимости от метода внутрисполостной биотерапии: комбинированная клеточно-цитокиновая или цитокиновая иммунотерапия.

Внутриплевральная ИЛ-2/аутол.ЛАК-иммунотерапия у больных с опухолевым плевритом

Проведенные исследования показали, что мононуклеарные лейкоциты, выделенные из плеврального экссудата больных с опухолевыми плевритами до начала иммунотерапии обладали низкой цитотоксичностью — $10,0 \pm 4,0\%$, что являлось недостаточным для достижения противоопухолевого эффекта. Полученные из МЛ, в результате экстракорпоральной активации ИЛ-2, аутологичные ЛАК-клетки характеризовались значительно большей ($p < 0,05$) противоопухолевой активностью: цитотоксичность ЛАК к опухолевым клеткам больного составляла $65,0 \pm 6,0\%$, а к опухолевым клеткам НК-чувствительной линии К-562 — $82,0 \pm 6\%$ ($p < 0,05$), в соотношении 5:1.

Иммунофенотип аутологичных ЛАК, характеризуется увеличением содержания клеток, экспрессирующих маркеры натуральных киллеров CD16, CD56, активационные антигены CD25, CD38 и HLA-DR, молекулы адгезии CD57, CD58, а также снижением относительного содержания CD3+Т-клеток, по сравнению со зрелыми МЛ плеврального экссудата. В результате было обнаружено, что на 3 сутки инкубации лимфоцитов с ИЛ-2 наряду с увеличением количества клеток с экспрессией активационных молекул не возрастало количество Т-регуляторных CD4+/CD25+Foxp3+ клеток.

ЛАК представляют собой активированные лимфоциты, типа пролимфоцитов, способные к митозу, также ЛАК содержат большое количество гранул, иногда заключенных в везикулы. Наиболее изученный компонент этих гранул перфорин, играет важнейшую роль в реакции цитотоксичности — формирует поры в мембране клетки-мишени и, благодаря этому, запускается цитолитический процесс. Помимо перфорина в состав гранул активированных лимфоцитов входят цитотоксические протеазы, в частности, гранзим В. Механизм цитолиза связан как с

высвобождением компонентов гранул активированных НК, так и с индукцией апоптоза различными секреторными продуктами этих клеток, и экспрессией молекул-лигандов на поверхности киллерных клеток.

Часто у больных с ОП содержание опухолевых клеток в плевральном выпоте значительно превышает количество лимфоцитов, что не позволяет выделить в чистом виде МЛ, пригодные для генерации ЛАК. Так, при цитологическом исследовании установлено, что в плевральном выпоте до лечения выявляется, как правило, значительное количество опухолевых клеток. Также определяются клетки мезотелия, гистиоидные клетки, лейкоциты. В середине иммунотерапии присутствуют лишь единичные опухолевые клетки с явлениями дегенерации и напротив, значительно увеличивается число активированных лимфоидных клеток, типа пролимфоцитов, обращает также внимание и адгезия лимфоцитов к опухолевым клеткам (как начальный визуализируемый этап их последующего лизиса в результате противоопухолевого эффекта ЛАК), далее в экссудате опухолевые клетки в результате их разрушения, как правило не определялись.

На основании полученных данных становится понятным, что внутриполостной способ введения может поддерживать высокий локальный уровень цитокина, создавая благоприятные условия для ИЛ-2-зависимой активации мононуклеарных лимфоцитов, присутствующих в плевральном экссудате пациента, а также ЛАК-клеток, вводимых внутривнутриплеврально.

В данную группу включено 28 больных опухолевыми плевритами: рак молочной железы у 9 больных, что составило 32,1%, немелкоклеточный рак легкого — 7 (25%), рак яичников — 5 (17,9%), рак почки — 4 (14,3%) и мезотелиома плевры — 3 (10,7%). Из них мужчин — 9 (32,2%) и женщин — 19 (67,8%). Медиана возраста — 57,2 лет. Статус состояния пациентов до начала внутривнутриплевральной ИЛ-2/аутол.ЛАК-иммунотерапии у 4 больных (14,3%) соответствовал ECOG-1, у 19 (67,9%) — ECOG -2 и у 5 (17,8%) пациентов с ECOG-3. Все 28 пациентов до начала иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения: только хирургическое лечение предшествовало у 4 пациентов (14,3%), комбинированное у 9 (32,2%),

комплексное у 10 (35,7%) и лекарственное у 5 (17,8%) больных. У 10 пациентов (35,7%) метастазы по плевре и плеврит были единственным проявлением опухолевой диссеминации, метастатическое поражение двух органов встречалось у 14 пациентов и мультиорганное (метастазы больше чем в двух органах) у 6 пациентов, что составило 21,4%.

Полный ответ от внутриплевральной ИЛ-2/аутол.ЛАК-иммунотерапии был отмечен у 15 (53,6%) больных, частичный — у 11 (39,3%), у 2 больных (7,1%) эффекта от лечения не было зарегистрировано. Объективный ответ после внутриплевральной ИЛ-2/аутол.ЛАК-иммунотерапии был отмечен у 26 больных и составил 92,9%. Рецидив плеврита отмечался у 3 больных (10,7%). Продолжительность объективного ответа составила 8,2 мес. Следует отметить, что частичная или полная регрессия экссудации наступала только тогда, когда в плевральном выпоте в конце иммунотерапии отсутствовали опухолевые клетки и отмечалось значительное количество активированных лимфоидных клеток и митозов. Показано, что пациенты с наличием серозного экссудата со слабой степенью накопления злокачественного плеврального выпота имели более быстрый и лучший ответ на внутриплевральную иммунотерапию.

У большинства пациентов внутриплевральное введение ИЛ-2 и аутологичных ЛАК-клеток сопровождалась гипертермией (82,1%) и общей слабостью (71,4%). Вместе с тем, гипертермию следует расценивать не как побочную реакцию внутриплевральной иммунотерапии, но и, главным образом, как проявление специфического действия ИЛ-2 и ЛАК-стимуляции системы противоопухолевого иммунитета. Гематологической, почечной и других видов токсичности у больных при данном виде лечения отмечено не было. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости иммунотерапии, требующие отмены лечения или снижения доз ИЛ-2 и ЛАК-клеток у пациентов не были зарегистрированы.

Таким образом, аутологичные ЛАК-клетки по своим морфо-функциональным характеристикам соответствуют активированным лимфоцитам, обладающим высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток пациента, а внутриплевральная ИЛ-

2/аутол.ЛАК-иммунотерапия хорошо переносима и высокоэффективна у больных с опухолевыми серозитами, резистентных к системной терапии. Однако следует отметить, что данный метод клеточной иммунотерапии весьма сложен в повсеместном практическом применении из-за трудоемкости сбора плеврального экссудата в стерильных условиях у каждого больного, транспортировку его в специализированную иммунологическую лабораторию, которые имеются только в единичных онкологических институтах нашей страны, а также не многочисленностью и отсутствием лимфоидных клеток в экссудате пациентов после предшествующей 2-3 линий системной терапии. В таких случаях лимфоциты были получены из периферической крови здоровых доноров.

Внутриплевральная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапия у больных с опухолевыми плевритами.

Проведенные исследования показали, что генерированные из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров аллогенные ЛАК-клетки, обладают достоверно большей цитотоксичностью по сравнению с интактными МЛ. При соотношении клетка-мишень — клетка-эффектор 1:5 МЛ лизировали 61% клеток линии К-562, в то время как в аналогичных условиях ЛАК вызывали гибель 90% опухолевых клеток. В меньших соотношения (1:2 и 1:1) эти различия были не столь значимы, хотя активность аллогенных ЛАК превышала таковую для МЛ. При исследовании иммунофенотипа, культивируемых аллогенных ЛАК, было показано, что у активированных ИЛ-2 лимфоцитов уровень экспрессии молекул адгезии и костимулирующих молекул достоверно выше, чем у интактных мононуклеарных лейкоцитов, также было зафиксировано выраженное повышение количества активированных NKp30+/NKG2D+НК (рис. 1). Вместе с тем, в популяции ЛАК были выявлены CD25+клетки, что может свидетельствовать о наличии в культуре лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к ИЛ-2. При инкубации МЛ в присутствии ИЛ-2 на 3 сутки отмечали повышение индукции ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , а также ИЛ-10 по сравнению со спонтанной продукцией цитокинов интактными МЛ. На 5 сутки сохранялся повышенным уровень ИФН- γ , экспрессируемого в

основном Th1 лимфоцитами и являющегося активатором клеток-эффекторов врожденного иммунитета. рецептор к ИЛ-2.

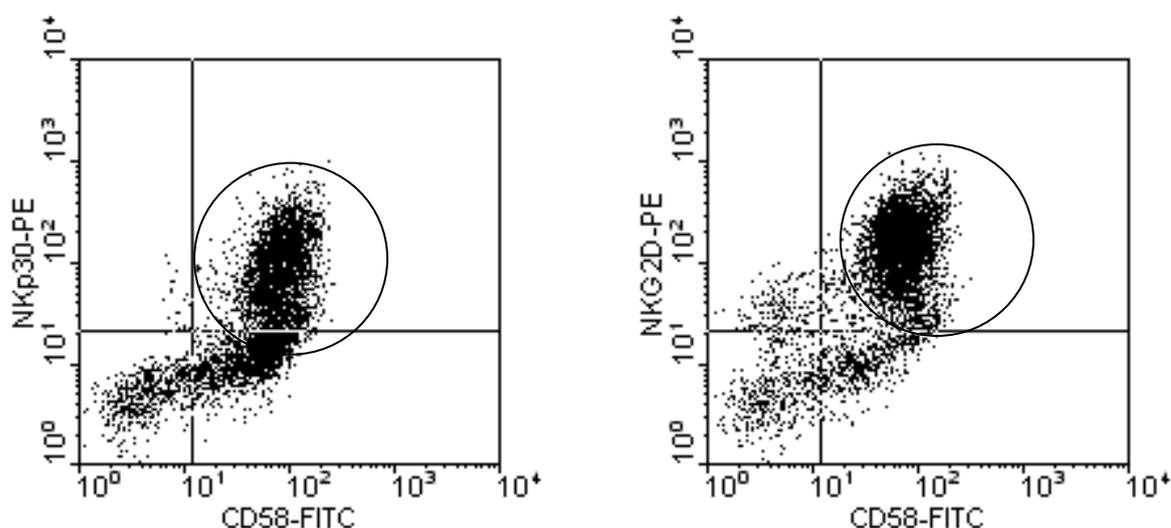
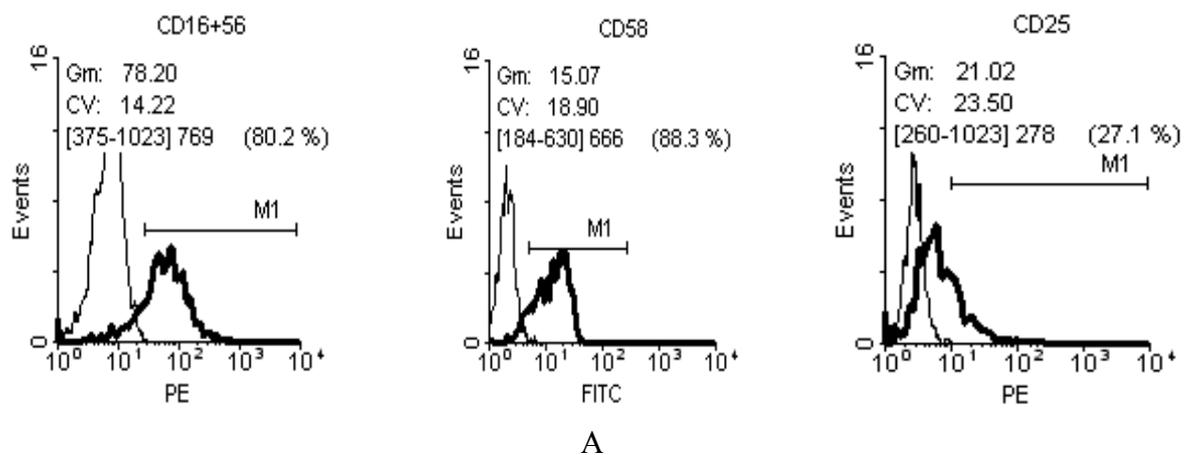


Рисунок 1 — Иммунофенотип ЛАК:

А) CD16/56⁺; CD58⁺ и CD25⁺ лимфоциты в популяции ЛАК.

Б) NKp30⁺ клетки, NKG2D⁺ клетки в популяции ЛАК.

Мононуклеарные лейкоциты, полученные из периферической крови здоровых доноров, при воздействии на них ИЛ-2, также как и аутологичные МЛ, подвергались пролиферации и активации, то есть происходила генерация активированных киллерных клеток (ЛАК). При цитологическом исследовании мазков, полученных из культуральной взвеси аллогенных (донорских) активированных ИЛ-2 лимфоцитов, показало, что на 3 сутки культивации возрастает количество клеток типа пролимфоцитов, имеющих

крупные размеры, большие ядра с преобладанием в них эухроматина и многочисленными пиронинофильными ядрышками. Клетки окружены широким ободком базофильной цитоплазмы, имеющей яркую пиронинофильную окраску, выявляемую в реакции Браше, и ШИК-положительный компонент, остающийся в контроле с амилазой при окраске по Шабадашу. ЛАК, обладая высокой киллерной активностью по отношению к опухолевым клеткам при этом не повреждали нетрансформированные клетки.

При исследовании уровня экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 среди CD4+CD25+ мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови здоровых доноров, было установлено, что доля CD4+CD25+Foxp3+ T-регуляторных лимфоцитов составляет около 3% ($3,2 \pm 1,1\%$). Вероятно, это может свидетельствовать в пользу существования регуляторных механизмов, которые поддерживают невысокий уровень CD4+/CD25+/FOXP3+ T-супрессоров по отношению к общему количеству лимфоцитов здорового организма. В отличие от аутологичных, аллогенные ЛАК-клетки, генерированные в течение 3 суток, используемые для внутриполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами (плевритами, асцитами и перикардитами), содержали ничтожно малое количество (3%) супрессорного подтипа T-рег, что не является принципиальным для реализации адекватного противоопухолевого ответа.

Следовательно, полученные результаты подтверждают целесообразность использования аллогенных ЛАК, генерированных на 3 сутки инкубации, для внутриполостной клеточной биотерапии при опухолевых серозитах, поскольку именно в эти сроки ЛАК активно продуцируют широкий спектр цитокинов и обладают наиболее высоким уровнем пролиферативной и цитотоксической (противоопухолевой) активности.

В данную группу включено 30 больных с опухолевыми плевритами, из них рак молочной железы у 16 пациенток (53,3%), рак яичников — 7 (23,3%), немелкоклеточный рак легкого — 5 (16,7%), рак почки — 2 (6,7%). Из них данный вид иммунотерапии получали 9 мужчин и 21 женщин в возрасте. Медиана возраста — 58,4 лет. У 9 пациентов (30,0%) метастазы по плевре и

плеврит был единственным проявлением опухолевой диссеминации, метастатическое поражение двух органов встречалось у 17 пациентов (56,7%) и мультиорганное (метастазы больше чем в двух органах) у 4 пациентов, что составило 13,3%. Статус состояния пациентов до начала внутривнутриплевральной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии у 5 больных (16,7%) соответствовал ECOG-1, у 21 (70,0%) — ECOG-2 и у 4 пациентов ECOG-3, что составило 13,3% от общего числа вошедших в данную подгруппу больных. Все 30 пациентов до начала данной внутривнутриплевральной иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения.

У 28 (93,4%) больных через 4 недели был отмечен объективный ответ от внутривнутриплевральной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии, из них у 17 (56,7%) пациентов был достигнут полный ответ опухолевого плеврита; частичный ответ был зарегистрирована у 11 пациентов (36,7%), а у 2 пациентов (6,6%) эффекта достигнуто не было. Рецидив опухолевого плеврита после иммунотерапии был выявлен у 4 пациентов (13,3%). Продолжительность объективного ответа после данной иммунотерапии составила 8,5 месяцев. Цитологическое исследование проводилось у всех больных с плевритом до начала и в процессе середине. При цитологическом исследовании установлено, что в плевральном выпоте до лечения выявлялось, как правило, значительное или умеренное количество опухолевых клеток. В конце курса у 28 пациентов, ответивших на лечение, в экссудате опухолевые клетки не определялись, что и коррелировало с наступлением клинического эффекта (93,4%). Более эффективная внутривнутриплевральная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапия была отмечена у больных с серозным характером опухолевого плеврита (полная регрессия у них отмечалась у 9 пациентов (30,0%) и частичная регрессия у 5 (16,7%) и с серозно-геморрагическим экссудатом (полная регрессия у них отмечалась у 8 пациентов (26,7%) и частичная регрессия у 4 (13,3%).

Внутриплевральная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапия в целом удовлетворительно переносилась пациентами и вызывала, главным образом, проявлениями гриппоподобного синдрома (гипертермия, озноб) как проявление стимуляции клеточного иммунитета, которые при

необходимости купировались антипиретиками. Гематологической, нефро- и других видов токсичности при данном лечении отмечено не было.

Таким образом, согласно полученным данным, метод внутриплевральной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии целесообразно применять у больных с опухолевыми плевритами при прогрессировании опухолевого процесса и неэффективной системной терапии, а также при индивидуальной непереносимости цитостатиков или при наличии противопоказаний к противоопухолевым лекарствам. При этом следует отметить хорошую переносимость и низкую токсичность данного метода клеточной иммунотерапии.

Внутриплевральная ИЛ-2–иммунотерапия у больных с опухолевыми плевритами.

При проведении внутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии в монорежиме достоверно возрастала цитотоксическая активность лимфоцитов, выделенных из плеврального экссудата. В частности, в конце курса (после 10 внутриплевральных введений препарата «Ронколейкин») киллерная активность лимфоцитов экссудата в отношении аутологичных опухолевых клеток повышалась с $10,0 \pm 4,0\%$ до $55,0 \pm 6,0\%$ ($p < 0,05$), что однако ниже цитотоксичности ЛАК, генерированных *ex vivo* из МЛ экссудата или периферической крови здоровых доноров (до 92%). Для иммунофенотипа полученных в процессе ИЛ-2-терапии МЛ экссудата характерно увеличение экспрессии маркера натуральных киллеров CD16 (до 34,0%), активационных антигенов CD25 (до 37,2%), CD38 (до 36,9%), молекул адгезии CD58 (до 78,1%) и молекул главного комплекса гистосовместимости II типа HLA-DR (до 59,3%) по сравнению с экспрессией тех же маркеров на поверхности МЛ, выделенных из экссудата до начала иммунотерапии.

В данную группу включено 35 больных с метастатическим плевритом: немелкоклеточный рак легкого — 5, рак молочной железы — 22, рак почки — 3, рак яичников — 5; из них 7 мужчин и 28 женщин, медиана возраста — 55,6 лет. Статус состояния пациентов до начала внутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии у 6 больных (17,1%) соответствовал ECOG-1, у 24 (68,6%) —

ECOG-2 и у 5 пациентов ECOG-3, что составило 14,3% от общего числа вошедших в данную подгруппу больных. Все 35 пациентов до начала внутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения: только хирургическое лечение предшествовало у 4 пациентов (11,4%), комбинированное у 16 (45,7%), комплексное у 12 (34,3%) и лекарственное у 3 больных (8,6%). При цитологическом исследовании в плевральном выпоте до начала иммунотерапии выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток и небольшое количество зрелых лимфоцитов (2-3 в поле зрения). В середине курса лечения 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. Через 4 недели после проведения внутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии полный ответ плеврита отмечен у 13 пациентов (37,2%), частичный ответ — у 15 пациентов (42,8%). В 7 (20,0%) случаях зарегистрировано отсутствие эффекта от проводимой иммунотерапии. Общая эффективность внутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии составила 80%. Рецидив опухолевого плеврита отмечен у 8 (22,8%) больных в сроки от 2 до 6 месяцев после лечения. Продолжительность объективного ответа на иммунотерапию в данной группе составила 7,9 месяцев. В конце иммунотерапии у 28 пациентов, ответивших на лечение, в экссудате опухолевые клетки не определялись, что и коррелировало с наступлением объективного клинического эффекта. Более эффективная внутриплевральная ИЛ-2-иммунотерапия была отмечена у больных с серозным характером экссудатом, а также у больных со слабой степенью накопления экссудата в плевральной полости. Внутриплевральная ИЛ-2-иммунотерапии больных с опухолевыми плевритами, вызывала, главным образом, гриппоподобный синдром, основным проявлением которого была гипертермия (77,1%) и общая слабость (65,7%). Гематологической, почечной и других видов токсичности у больных при данном виде лечения отмечено не было. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости иммунотерапии, требующие отмены

лечения или снижения доз ИЛ-2 и ЛАК-клеток у пациентов не были зарегистрированы. На рисунке 2 приведены КТ-томограммы больного с метастатическим раком правого легкого (аденокарцинома) у которого через 1 месяц после завершения внутриплевральной ИЛ-2-иммунотерапии была зарегистрирована полная регрессия опухолевого плеврита.

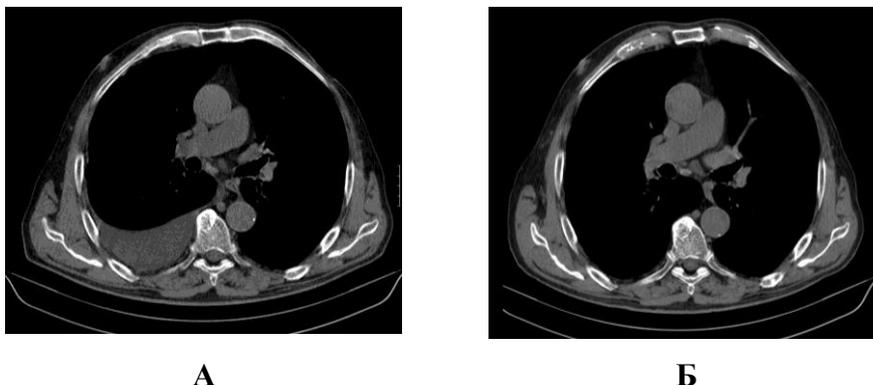


Рисунок 2 — Компьютерные томограммы пациента К., 72 лет.

Метастатический рак правого легкого. Метастазы по плевре справа. Опухолевый плеврит справа. Наличие экссудата в правой плевральной полости до начала внутриплевральной иммунотерапии (А) и через 1 месяц после ее завершения (Б).

В таблице 1 представлены результаты сравнения 3 методов внутриплевральной иммунотерапии.

Т а б л и ц а 1 — Результаты клинической эффективности трех вариантов внутриплевральной иммунотерапии опухолевых плевритов

Клинический эффект	ИЛ-2/аутол.ЛАК (n=28)	ИЛ-2/аллоген.ЛАК (n=30)	ИЛ-2 (n=35)
Полная регрессия, n (%)	15 (53,6%)	17 (56,7%)	13 (37,2%)
Частичная регрессия	11 (39,3%)	11 (36,7%)	15 (42,8%)
Без эффекта	2 (7,1%)	2 (6,6%)	7 (20,0%)
Объективный ответ	26 (92,9%)	28 (93,4%)	28 (80,0%)
Рецидив плеврита	3 (10,7%)	4 (13,3%)	8 (22,8%)
Продолжительность объективного ответа, мес.	8,2	8,5	7,9

Таким образом, результаты клинической эффективности у больных с опухолевыми плевритами трех режимов внутривлебральной иммунотерапии вполне сопоставимы и не имеют достоверных различий, однако внутривлебральная иммунотерапия ИЛ-2 в монорежиме в отличие от клеточной терапии более проста и доступна для применения в отечественной онкологической практике.

Внутрибрюшинная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-терапия у больных с опухолевыми асцитами.

В подгруппу больных с верифицированными опухолевыми асцитами получавших внутрибрюшинную ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапию был включен 41 пациент: 23 больных (56,1%) страдающих раком яичников и 18 пациентов (43,9%) — раком органов желудочно-кишечного тракта (у 11 пациентов — рак желудка, 4 — рак толстой кишки, 2 — рак поджелудочной железы и у 1 пациента рак Фатерова соска). Из них лечение получили 32 женщины (78,1%) и 9 мужчин (21,9%). Медиана возраста — 57,5 лет. У 16 пациентов (39,1%) канцероматоз брюшины и асцит был единственным проявлением опухолевой диссеминации, метастатическое поражение двух органов встречалось у 21 пациента (51,2%) и мультиорганное (метастазы больше чем в двух органах) у 4 пациентов, что составило 9,7%. Статус состояния пациентов до начала иммунотерапии у 10 больных (24,4%) соответствовал ECOG-1, у 24 (58,5%) — ECOG-2 и у 7 пациентов ECOG-3, что составило 17,3% от общего числа вошедших в данную подгруппу больных. Все пациенты до начала внутрибрюшинной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения: только хирургическое лечение предшествовало у 11 пациентов (26,8%), комбинированное у 22 (53,6%), комплексное у 1 больной (2,5%) и лекарственное у 7 больных (17,1%)

У больных раком яичников полная регрессия была достигнута у 11 женщин, что составило 47,8%; частичная регрессия с остаточным экссудатом не вызывающим жалоб у больных — у 8 пациенток (34,8%) и у 4 пациенток (17,4%) эффекта от данного лечения отмечено не было. Отсутствие эффекта в виде повторного накопления асцита возникло у 3

больных в сроки от 2 до 4 месяцев после лечения. Общая эффективность иммунотерапии у больных с раком яичников составила 82,6%. Также для оценки эффективности лечения исследовалась динамика уровня онкомаркера СА-125 у всех 23 пациенток раком яичников. Проведенный статистический анализ с применением критерия Вилкоксона показал, что после окончания внутрибрюшинной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии в данной группе более чем у 50% пациенток отмечалось достоверное снижение концентрации в крови определяемого онкомаркера СА-125: $T=31$, $Z=3.2544$, $p=0,0011$. Регрессионный анализ также указывает на достоверность отмеченных изменений: $R=0,78816226$, $R=62119975$, $Adjusted\ R=0,60316164$, $F(1,21)=34,438$, $Std.Err.\ of\ estimate: 330,74$, $B=0,55244$, $Std.Err(p=0,00008)$.

Из 41 пациента с ОА различных локализаций после внутрибрюшинной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии у 30 больных (73,2%) был отмечен объективный ответ: полная регрессия отмечалась у 16 пациентов (39,1%) и частичная регрессия у 14 (34,1%). Эффекта от иммунотерапии не было отмечено у 11 пациентов (26,8%). Рецидив ОА возник у 8 пациентов, что составило 19,5%. Продолжительность объективного ответа после иммунотерапии составила 5,1 месяцев. На фоне иммунотерапии всем больным проводилось цитологическое исследование, при котором установлено, что в асцитической жидкости до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток. В конце курса у 30 пациентов (73,2%), ответивших на лечение, в экссудате опухолевые клетки не определялись, что коррелировало с наступлением объективного клинического эффекта. Более эффективной внутрибрюшинная иммунотерапия была у пациентов с серозным опухолевым асцитом, а также у больных со слабой степенью накопления экссудата в брюшной полости.

Внутрибрюшинная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапия у больных с опухолевыми асцитами, вызывала, главным образом, гриппоподобный синдром, основным проявлением которого были гипертермия и общая слабость у 90,2% и 78,0% пациентов соответственно. Гипотензия (21,9%) и тошнота 1-2 степени (7,3%) редко проявлялась у пациентов на фоне данной иммунотерапии, спастические боли в животе, которые купировались

спазмолитиками, имели место у 13 пациентов (31,7%). Гематологической, почечной и других видов токсичности у больных при данном виде лечения отмечено не было. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости иммунотерапии, требующие отмены лечения или снижения доз ИЛ-2 и ЛАК-клеток у пациентов не были зарегистрированы.

Таким образом, согласно полученным данным, метод внутрибрюшинной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии опухолевых асцитов целесообразно применять у больных при прогрессировании рака яичников и органов ЖКТ (наличие микро- и макроканцероматоза брюшины и ОА) при неэффективной химиотерапии, а также при индивидуальной непереносимости цитостатиков или при наличии противопоказаний к химиотерапии. При этом следует отметить хорошую переносимость и низкую токсичность данного метода терапии.

Внутрибрюшинная ИЛ-2-биотерапия у больных с опухолевыми асцитами.

Цитотоксическая активность лимфоцитов, выделенных из асцитической жидкости в конце внутрибрюшинной ИЛ-2-иммунотерапии после 10-15 введений «Ронколейкина» в отношении аутологичных опухолевых клеток была значительно выше ($62,0 \pm 6,0\%$) по сравнению с $10,0 \pm 4,0\%$ неактивированных МЛ плеврального экссудата, ($p < 0,05$). Иммунофенотип лимфоцитов, выделенных из асцитической жидкости в процессе внутрибрюшинного лечения Ронколекином характеризуется повышенной экспрессией активационных антигенов (CD25, HLA-DR), молекул адгезии (CD57, CD58, а также маркеров натуральных киллеров (CD16, CD56) по сравнению лимфоцитами, полученными из злокачественного выпота брюшной полости до начала иммунотерапии. На основании этого можно заключить, что отмечается стимуляция эффекторного звена врожденного иммунитета. Также несколько увеличивается экспрессия молекул адгезии CD58 (с 42,2 до 58,0%), что позволяет лимфоцитам реализовывать их цитотоксические свойства при непосредственном контакте с опухолевой клеткой. В конце лечения наблюдали повышение экспрессии активационного рецептора к ИЛ-2 маркера CD25 (с 6,1 до 16,2%).

Всего в данную группу был включен 31 пациент: 17 (54,8%) пациенток раком яичников и 14 (45,2%) пациентов раком других локализаций (12 — рак органов желудочно-кишечного тракта и 2 пациентки раком молочной железы), 22 женщины (70,1%) и 9 мужчин (29,9%). Медиана возраста — 55,2 лет. Статус состояния пациентов до начала внутрибрюшинной ИЛ-2-иммунотерапии у 8 больных (25,8%) соответствовал ECOG-1, у 17 (54,8%) — ECOG-2 и у 6 пациентов ECOG-3, что составило 19,4% от общего числа вошедших в данную подгруппу больных. Все пациенты до начала внутрибрюшинной иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения: только хирургическое лечение предшествовало у 8 пациентов (25,8%), комбинированное у 15 (48,4%), комплексное у 2 больных (6,4%) и лекарственное у 6 больных (19,4%). У 12 пациентов (38,7%) канцероматоз брюшины и асцит был единственным проявлением опухолевой диссеминации, метастатическое поражение двух органов встречалось у 16 пациентов (51,6%) и мультиорганное (метастазы больше чем в двух органах) у 3 пациентов, что составило 9,7%, 58,1% случаев у больных в данной группе преобладали серозные асциты в основном при слабой степени накопления перитонеальной экссудации — 2,0%.

Полная регрессия асцита у больных раком яичников была достигнута у 4 пациенток (23,5%); частичная регрессия с остаточным экссудатом не вызывающим жалоб у больных — у 8 пациенток (47,1%) и у 5 пациенток (29,4%) эффекта от данного лечения не было. Повторное накопление асцита возникло у 4 больных в сроки от 2 до 4 месяцев после данного лечения. Объективный ответ на внутрибрюшинную ИЛ-2-иммунотерапию у больных раком яичников составил 70,6%. В данной группе исходно и после иммунотерапии у больных раком яичников, также была изучена динамика показателей в сыворотке крови наиболее информативного для данного заболевания лабораторного параметра, как онкомаркер СА-125. У 17 пациенток данной группы, получавших внутрибрюшинную ИЛ-2-иммунотерапию по поводу опухолевого асцита проводилась статистическая обработка полученных данных с определением корреляционных зависимостей от объективного ответа после лечения. Проведенный

статистический анализ с применением критерия Вилкоксона показал, что после курса примененной терапии более, чем у 50% пациенток в данной группе наблюдали достоверное снижение концентрации в крови определяемого маркера: $T=26$, $Z=2,3905$, $p=0,01682$. Регрессионный анализ также указывает на достоверность отмеченных изменений: $R=0,69430127$, $R=0,62119975$, $Adjusted\ R=0,44752453$, $F(1,21)=13,96$, $Std.Err.\ of\ estimate: 167,2272$, $t(15) = 1,1164$, $p=0,281833$, $B=0,4926$, $Std.Err\ 0,1318$ ($p=0,001986$).

Также был проведен сравнительный анализ эффективности применения двух методов иммунотерапии при лечении пациенток, больных раком яичников, сопряженным с опухолевым асцитом. Данные описательной статистики, характеризующей динамику СА-125, приведены на рисунке 3.

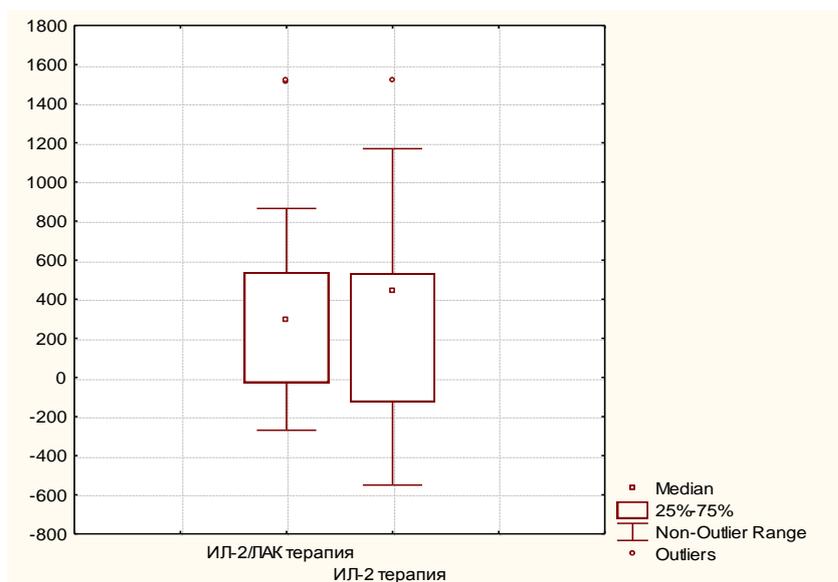


Рисунок 3 — Влияние различных методов иммунотерапии на интенсивность снижения сывороточного уровня СА-125 у больных раком яичников с опухолевым асцитом

Полученные результаты указывают на отсутствие достоверных различий между интенсивностью влияния обоих методов внутрибрюшинной иммунотерапии на динамику сывороточного уровня тестируемого онкомаркера СА-125 ($p=0,912855$) и свидетельствуют об адекватности оценки эффективности иммунотерапии по уровню данного онкомаркера в сыворотке крови исходно и в конце лечения.

Таким образом, на основании полученных клинико-лабораторных данных, предложенная внутрибрюшинная ИЛ-2-иммуноterapia — является эффективным противоопухолевым методом лечения больных с прогрессирующим и резистентным к системной терапии, раком яичников с наличием опухолевого асцита.

У больных, получавших по поводу ОА внутрибрюшинную ИЛ-2-иммуноterapia, полная регрессия была достигнута у 6 пациентов (19,4%); частичная регрессия остаточным экссудатом, не вызывающим жалоб у больных — у 13 пациентов (41,9%) и у 12 пациентов (38,7%) эффекта от данного лечения отмечено не было. Повторное накопление асцита возникло у 8 больных, что составило 25,8% в сроки от 2 до 4 месяцев после окончания ИЛ-2-иммунотерапии. Объективный ответ на внутрибрюшинную ИЛ-2-иммуноterapia был зарегистрирован у составил 61,3% пациентов. Продолжительность объективного ответа составила 4,8 месяцев.

При цитологическом исследовании установлено, что в асцитической жидкости до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток. В конце курса у 19 пациентов (61,3%), ответивших на лечение, в экссудате опухолевые клетки не определялись, что коррелировало с наступлением объективного клинического эффекта. Наиболее частые объективные ответы на внутрибрюшинную ИЛ-2-иммуноterapia были у больных с серозным характером асцитической жидкости: полная регрессия 4 (12,9%) пациентов и частичная регрессия у 10 (32,2%) больных и у пациентов со слабой степенью накопления экссудата в брюшной полости: полная регрессия у 5 (16,1%) больных и частичная регрессия была отмечена у 6 (19,3%) пациентов.

Внутрибрюшинная ИЛ-2-иммуноterapia практически не вызывала у больных побочных эффектов, за исключением проявлений гриппоподобного синдрома: гипертермию (у 80,6%) и общую слабость — (83,6%). Спастические боли в животе и тошнота проявлялись у больных редко — в 25,8% и в 6,4% соответственно. Изменения показателей периферической крови, функции почек и печени при данном виде лечения не отмечалось. Аллергические реакции и какие-либо иные виды непереносимости

внутрибрюшинной иммунотерапии, требующие отмены лечения или снижения доз ИЛ-2, не были зарегистрированы.

Метод внутрибрюшинной ИЛ-2-иммунотерапии опухолевых асцитов целесообразно применять у больных при прогрессировании рака яичников и органов ЖКТ после 1-2 линий системной противоопухолевой терапии в виде проявлений микро- и макроканцероматоза брюшины и ОА, а также при индивидуальной непереносимости цитостатиков или противопоказаниях к их назначению.

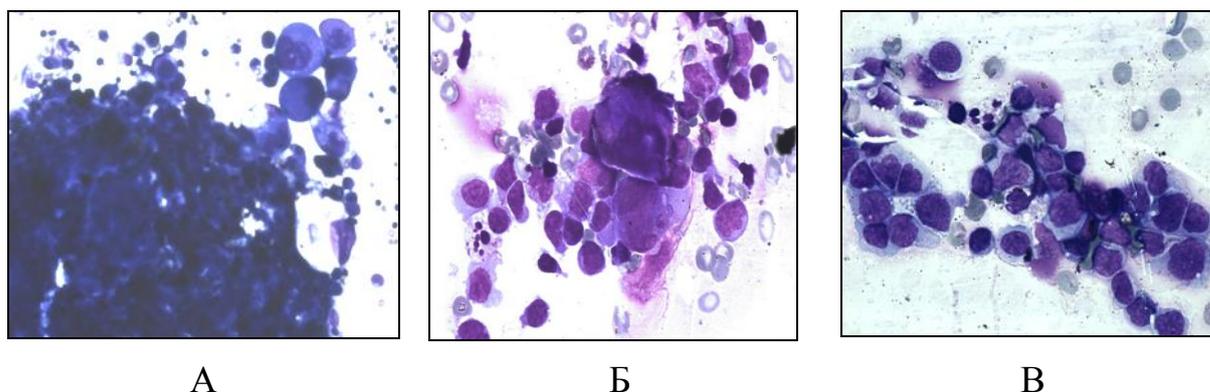


Рисунок 4 — Пациентка Б., 57 лет

Метастатический рак яичников, состояние после комбинированного лечения (хирургическое лечение с последующими тремя линиями химиотерапии). Прогрессирование болезни: канцероматоз брюшины, опухолевый асцит. Состояния после внутрибрюшинной ИЛ-2-иммунотерапии. Полная регрессия асцита и частичная регрессия метастазов по брюшине.

Цитограмма опухолевого экссудата до начала внутрибрюшинной иммунотерапии (А): представлен конгломерат опухолевых клеток, а также незначительное количество зрелых лимфоцитов. Окраска азур-эозином. Ув. 400. Цитограмма опухолевого экссудата в середине внутрибрюшинной иммунотерапии (Б): видны единичные опухолевые клетки в стадии деградации, окруженные активированными лимфоцитами типа иммунобластов (пролимфоцитов). Цитограмма опухолевого экссудата в конце внутрибрюшинной иммунотерапии (В): в остаточных количествах

асцита опухолевые клетки отсутствовали, отмечены апоптотические тельца и активированные лимфоциты. Окраска азур-эозином. Ув. 900.

При сравнении двух лечебных режимов внутрибрюшинной иммунотерапии не выявлено достоверных различий в клинической эффективности, однако внутрибрюшинная ИЛ-2-иммунотерапия более доступна в повсеместном ее применении в отечественной практической онкологии в отличие от клеточной иммунотерапии (табл. 2).

Т а б л и ц а 2 — Сравнительная эффективность двух вариантов внутрибрюшинной иммунотерапии при опухолевых асцитах

Клинический эффект	ИЛ-2/аллоген.ЛАК (n=41)	ИЛ-2 (n=31)	P
Полный ответ, n (%)	16 (39,1%)	6 (19,4%)	0,45
Частичный ответ	14 (34,1%)	13 (41,9%)	0,57
Без эффекта	11 (26,8%)	12 (38,7%)	0,52
Объективный ответ	30 (73,2%)	19 (61,3%)	0,67
Рецидив асцита	8 (19,5%)	7 (25,8%)	0,52
Продолжительность объективного ответа, мес.	5,1	4,8	0,74

Таким образом, внутрибрюшинная ИЛ-2-иммунотерапия может способствовать регрессии опухолевых асцитов при прогрессировании химиорезистентных форм рака яичников и органов желудочно-кишечного тракта при ее удовлетворительной переносимости.

Внутриперикардальная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-терапия у больных с опухолевыми перикардитами

В данную группу вошли 23 пациента: у 9 (39,1%) перикардит был проявлением опухолевой диссеминации при немелкоклеточном раке легкого, у 9 (39,1%) — при раке молочной железы, у 4 (17,4%) был обусловлен прогрессированием рака яичников и у 1 пациентки (4,4%) мезотелиомой

плевры. Исследуемая группа пациентов включала 14 женщин (60,8%) и 9 мужчин (39,2%). Медиана возраста 48,6 лет. Статус состояния пациентов до начала иммунотерапии у 3 больных (13,1%) соответствовал ECOG-1, у 16 (69,5%) — ECOG-2 и у 4 пациентов ECOG-3, что составило 17,4% от общего числа вошедших в данную подгруппу больных. Все 23 пациентов до начала данной внутривнутриперикардальной иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения: только хирургическое лечение предшествовало у 5 пациентов (24,7%), комбинированное у 9 (39,1%), комплексное у 4 (17,4%) и лекарственное у 5 (21,7%) больных. У 2 пациентов (8,8%) метастазы в перикард и перикардит был единственным проявлением опухолевой диссеминации, метастатическое поражение двух органов встречалось у 14 пациентов (60,8%) и мультиорганное (метастазы больше чем в двух органах) у 7 пациентов, что составило 30,4%.

При проведении внутривнутриперикардальной ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапии объективный ответ был достигнут у 22 пациентов (95,7%): из них полная регрессия перикардита была отмечена у 14 пациентов (60,9%), частичная регрессия — у 8 пациентов (34,8%) и в 1 (4,3%) случае зарегистрировано отсутствие эффекта. Повторное накопление злокачественного выпота в перикарде отмечено у 2 (8,6%) больных, через 2 и 6 месяцев после иммунотерапии. Продолжительность объективного ответа после иммунотерапии составила 3,4 месяца. Клинический эффект у всех больных подтверждался эхокардиографией или компьютерной томографией ОГК. При цитологическом исследовании установлено, что в перикардальном экссудате до лечения выявлялось, как правило, значительное или умеренное количество опухолевых клеток. В конце курса у 22 пациентов, ответивших на лечение, в экссудате опухолевые клетки не определялись, что и коррелировало с наступлением объективного клинического эффекта.

Внутриперикардальная ИЛ-2/аллоген.ЛАК-иммунотерапия в целом была удовлетворительна переносима пациентами с опухолевыми перикардитами. Основными побочными эффектами были проявления гриппоподобного синдрома (главным образом гипертермия у 86,9% и общая

слабость — 60,8%). 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 и аллоген.ЛАК, не были зарегистрированы.

Внутриперикардальная ИЛ-2-биотерапия у больных с опухолевыми перикардитами.

При исследовании на НК-чувствительной линии опухолевых клеток К-562 исходная цитотоксичность лимфоцитов составляла $40\pm 5\%$, а стимулированная внутриперикардальным введением ИЛ-2 оказалась достаточно высокой и составила $90\pm 8\%$. Иммунофенотип лимфоцитов, выделенных из перикардального экссудата в процессе внутриперикардального лечения Ронколейкином характеризуется повышенной экспрессией активационных антигенов (CD25, CD38, HLA-DR), молекул адгезии (CD57, CD58), а также увеличением содержания натуральных киллеров (CD16, CD56) по сравнению лимфоцитами, полученными из злокачественного выпота до начала ИЛ-2-иммунотерапии, что указывает на фенотип ЛАК.

По поводу опухолевого перикардита 15 пациентам была проведена внутриперикардальная ИЛ-2-иммунотерапия с использованием Ронколейкина: 6 больных (40,0%) — немелкоклеточный рак легкого, 5 пациенток (33,3%) — рак молочной железы, у 3 (20%) — рак яичников и у 1 (6,7%) — рак почки. Исследуемая группа пациентов включала 10 женщин (66,7%) и 5 мужчин (33,3%). Медиана возраста — 53,4 года. Все 15 пациентов до начала внутриперикардальной ИЛ-2-иммунотерапии получали различные виды противоопухолевого лечения: только хирургическое лечение предшествовало иммунотерапии у 3 пациентов (20,0%), комбинированное у 5 (33,3%), комплексное у 4 (26,7%) и лекарственное у 3 (20,0%) больных. Статус состояния пациентов до начала внутриперикардальной ИЛ-2-иммунотерапии у 1 больного (6,7%) соответствовал ECOG-1, у 9 (60,0%) — ECOG-2 и у 5 пациентов ECOG-3, что составило 33,3% от общего числа вошедших в данную подгруппу больных. У 1 пациента (6,7%) метастазы в

перикард и перикардит был единственным проявлением опухолевой диссеминации, метастатическое поражение двух органов встречалось у 10 пациентов (66,6%) и мультиорганное у 4 пациентов, что составило 26,7%. У 60% пациентов в данной группе преобладал серозный характер экссудата в основном при слабой степени накопления злокачественного выпота — 53,4%. В перикардальном выпоте до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток и небольшое количество зрелых лимфоцитов (1-3 в поле зрения). В конце лечения у большинства больных опухолевые клетки отсутствовали, в экссудате опухолевые клетки обнаруживались только у 2 пациентов с аденокарциномой легкого, что и напрямую коррелировало с не эффективностью данного вида иммунотерапии. При проведении внутривнутриперикардальной ИЛ-2-иммунотерапии объективный ответ был зарегистрирован у 13 пациентов (86,7%): полная регрессия была отмечена у 8 пациентов (53,5%), а частичная регрессия (наличие небольшого количества жидкости в перикарде — 100-150 мл) — у 5 пациентов (33,2%). В 2 (13,3%) случае было зарегистрировано отсутствие эффекта. Рецидив перикардита был отмечен только у 1 (6,6%) больного с аденокарциномой легкого через 3 месяца после внутривнутриперикардальной иммунотерапии. Продолжительность объективного ответа составила 3,2 месяцев. Наиболее часто полные регрессии на внутривнутриперикардальную ИЛ-2-иммунотерапию были отмечены у пациентов с серозным экссудатом и со слабой степенью его накопления. Внутривнутриперикардальная ИЛ-2-иммунотерапия при опухолевых перикардитах была удовлетворительно переносима больными и вызывала у большинства из них лишь проявления гриппоподобного синдрома (гипертермии — 80,0% и общая слабость — 60,0%), как следствие стимуляции противоопухолевого иммунитета, который в целом легко купировался пероральными антипиретиками. К редким побочным эффектам следует отнести гипотензию, которая встречалась лишь только у одной пациентки на фоне внутривнутриперикардального лечения ИЛ-2 (6,7%). Других видов токсичности и аллергических реакций зарегистрировано не было.

При сравнении двух лечебных режимов внутривнутриперикардиальной биотерапии (табл. 3) не выявлено достоверных различий в клинической эффективности.

Т а б л и ц а 3 — Сравнительная эффективность внутривнутриперикардиальной биотерапии у больных с опухолевыми перикардитами

Эффективность	ИЛ-2/аллоген.ЛАК (n=23)	ИЛ-2 (n=15)	P
Полная регрессия, n (%)	14 (60,9%)	8 (53,4%)	0,57
Частичная регрессия	8 (34,8%)	5 (33,3%)	1
Объективный ответ	22 (95,7%)	13 (86,7%)	0,52
Без эффекта	1 (4,3%)	2 (13,3%)	0,67
Рецидив перикардита	2 (8,6%)	1 (6,6%)	0,74
Продолжительность объективного ответа, мес.	3,4	3,2	1

Таким образом, внутривнутриперикардиальная ИЛ-2-иммунотерапия является высокоэффективным и низкотоксичным методом противоопухолевого лечения больных с опухолевыми перикардитами, резистентных к системной терапии или имеющих противопоказания к ней.

ВЫВОДЫ

1. Внутриполостная биотерапия с применением рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) и ЛАК-клеток показана больным с опухолевыми серозитами, резистентным к системной противоопухолевой терапии и пациентам, которым невозможно проведение стандартного лечения в связи с тяжестью состояния или индивидуальной непереносимостью лекарственных препаратов.

2. Аутологичные и аллогенные ЛАК-клетки по своим морфофункциональным характеристикам соответствуют активированным лимфоцитам, обладающим высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток пациента. Иммунофенотип ЛАК, а также лимфоцитов эксудатов, активированных при внутриполостном введении рекомбинантного интерлейкина-2, характеризуется увеличением содержания клеток, экспрессирующих маркеры натуральных киллеров CD16 и CD56, активационные антигены CD25, CD38 и HLA-DR, молекулы адгезии CD57 и CD58, а также снижением относительного содержания CD3+Т-клеток.

3. Культивирование лимфоцитов, в течение 3 суток, в присутствии рекомбинантного интерлейкина-2, способствует формированию ЛАК без увеличения содержания субпопуляции CD4+CD25+Foxp3+ Т-регуляторных клеток.

4. Эффективная разовая доза рекомбинантного интерлейкина-2, при внутриполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами, соответствует 1 млн. МЕ, а суммарная доза препарата при опухолевых плевритах, асцитах и перикардитах составляет 10 млн. МЕ, 15 млн. МЕ и 5 млн. МЕ, соответственно.

5. В процессе внутриполостной биотерапии, согласно результатам цитологического исследования эксудата, у больных с опухолевыми серозитами, на фоне появления активированных лимфоцитов, отмечается дегенерация опухолевых клеток с их последующим исчезновением, что коррелирует с наступлением объективного ответа.

6. Внутриполостная биотерапия у больных с опухолевыми серозитами характеризуется высокой клинической эффективностью и позволяет достичь

объективного ответа для опухолевых плевритов: при использовании ИЛ-2 и аутологичных ЛАК — 92,9%, ИЛ-2 и аллогенных ЛАК — 93,4% и ИЛ-2 — 80% (продолжительность объективного ответа: 8,2; 8,5 и 7,9 месяцев соответственно); для опухолевых асцитов: при ИЛ-2 и аллогенных ЛАК — 73,2% и ИЛ-2 — 61,3% с продолжительностью объективного ответа: 5,1 и 4,8 месяцев (в 69,5% и 64,7% случаев в 2 группах больных раком яичников после внутрибрюшинной иммунотерапии в сыворотке крови отмечалось некоторое снижение уровня онкомаркера СА-125 по сравнению с исходно повышенным уровнем); для опухолевых перикардитов: при ИЛ-2 и аллогенных ЛАК — 95,7% и ИЛ-2 — 86,7% (продолжительность объективного ответа составила 3,4 и 3,2 месяцев).

7. Внутриполостная биотерапия является низкотоксичным видом противоопухолевого лечения. Основным побочным эффектом, в подавляющем большинстве случаев, был гриппоподобный синдром разной степени выраженности. Гематологической и других видов токсичности у пациентов на фоне данного лечения отмечено не было.

8. Внутриполостную биотерапию при опухолевых серозитах, следует начинать с рекомбинантного интерлейкина-2 в монорежиме, вследствие схожей эффективности с клеточной терапией и доступности для широкого практического применения, а при его неэффективности лечение может быть дополнено введением в серозную полость ЛАК-клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

У больных с диссеминированными злокачественными новообразованиями, осложненными опухолевыми серозитами, при развитии в результате системного противоопухолевого лекарственного лечения резистентности, при общем тяжелом состоянии больных (ECOG/ВОЗ 2-3) при котором не возможно проведение системной или лучевой терапии, а также при изначально низкочувствительных к цитостатикам опухолей рекомендовано проведение внутриполостной биотерапии:

при опухолевых плевритах:

рекомендовано проводить ИЛ-2-иммунотерапию по следующей схеме: после максимального осушения плевральной полости внутриплеврально через катетер «Плеврокан» вводить рекомбинантный интерлейкин-2 (Ронколейкин) 1 раз в день по 1 млн. МЕ, разведенного в 20 мл физиологического раствора 1-5, 8-12 дни с осушением плевральной полости через 1-2 дня, при завершении биотерапии «Плеврокан» необходимо удалить;

— при отсутствии эффекта от введения ИЛ-2 в монорежиме, рекомендуется дополнить внутриплевральную биотерапию использованием аллогенных ЛАК-клеток, полученных из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров по схеме: после дренирования и катетеризации плевральной полости и ее максимального осушения внутриплеврально вводить донорские ЛАК-клетки по 100-150 млн. МЕ, разведенные в 20 мл физиологического раствора, в 1-5, 8-12 дни с осушением плевральной полости через 1-2 дня, при завершении биотерапии «Плеврокан» необходимо удалить.

при опухолевых асцитах:

рекомендовано проводить внутрибрюшинную ИЛ-2-иммунотерапию по схеме: после максимального осушения брюшной полости внутрибрюшинно через катетер «Плеврокан» вводить рекомбинантный интерлейкин-2 (Ронколейкин) по 1 млн. МЕ в 50 мл физиологического раствора 1 раз в день, 1-5, 8-12, 15-19 дни, с осушением брюшной полости через 1-2 дня, при завершении биотерапии «Плеврокан» необходимо удалить;

— при отсутствии эффекта от введения ИЛ-2 в монорежиме, следует дополнить внутрибрюшинную биотерапию использованием аллогенных ЛАК-клеток, полученных из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров по схеме: после максимального осушения брюшной полости внутрибрюшинно через катетер вводить донорские ЛАК-клетки по 100-150 млн. МЕ в 1-3, 8-10, 15-17 дни с осушением брюшной полости через 1-2 дня, при завершении биотерапии «Плеврокан» необходимо удалить.

при опухолевых перикардитах:

рекомендовано проводить ИЛ-2-иммунотерапию по схеме: после максимального осушения полости перикарда внутривнутриперикардiallyно через катетер «Плеврокан» вводить рекомбинантный интерлейкин-2 (Ронколейкин) по 1 млн. МЕ в 20 мл физиологического раствора 1 раз в день 1-5, 7-8 дни, с осушением полости перикарда через день, через 1-2 дня, при завершении биотерапии «Плеврокан» необходимо удалить;

— при отсутствии эффекта после введения ИЛ-2 в монорежиме, следует дополнить внутривнутриперикардiallyную биотерапию использованием аллогенных ЛАК-клеток, полученных из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови здоровых доноров по схеме: после максимального осушения полости перикарда внутривнутриперикардiallyно через катетер вводить донорские ЛАК-клетки по 100 млн. МЕ в 1-5 дни с осушением полости перикарда через 1-2 дня, при завершении биотерапии «Плеврокан» необходимо удалить.

Цитологический контроль экссудатов серозных полостей рекомендуется проводить до начала и после окончания внутривнутриполостной биотерапии. Контроль с помощью методов лучевой диагностики за течением опухолевого серозита проводить до начала лечения, в конце лечения, через 1 месяц и далее каждые 3 месяца.

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК РФ**

1. Вершинина, М.Ю. Характеристика лимфокин-активированных киллеров, полученных из натуральных киллеров, -Т-клеток больных с опухолевым поражением печени / М.Ю. Вершинина, Е.О. Халтурина, Ю.И. Патютко, Д.А. Забежинский, **К.С. Титов** // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2004. — № 12. — С. 32-36.
2. Шубина, И.Ж. Сравнительная характеристика лимфокин-активированных киллеров, генерированных из различных источников / И.Ж. Шубина, **К.С. Титов**, О.В. Лебединская, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. — 2006. — №3. — С. 43-50.
3. Чикилева, И.О. Содержание Т-регуляторных лимфоцитов CD4+C25+Foxp3+ в популяции лимфокин-активированных киллеров / Н.П. Велижева, И.Ж.Шубина, **К.С. Титов**, М.В.Киселевский // Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н.Блохина РАМН. — 2008. — №3. — С. 16-25.
4. **Титов, К.С.** Использование рекомбинантного интерлейкина-2 при внутриплевральном лечении опухолевых плевритов / **К.С. Титов**, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, И.Н.Михайлова И.Ж.Шубина, Л.М.Родионова, И.Е. Синельников, К.Ю. Тополь, А.Н. Грицай // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — № 11. — С. 547-549.
5. **Титов, К.С.** Биотерапия опухолевых перикардитов / **К.С. Титов**, И.Ж. Шубина, С.М. Волков, Л.М. Родионова, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. — 2009. — № 4. — С. 9-12.
6. **Титов, К.С.** Внутриплевральная иммунотерапия метастатических плевритов у больных раком молочной железы / **К.С. Титов**, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский, И.Н. Михайлова, И.Ж. Шубина, А.Н. Грицай, И.Е. Синельников, Л.М. Родионова // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2009. — № 3-4. — С. 34-38.
7. **Титов, К.С.** Внутриплевральная иммунотерапия интерлейкином-2 больных с метастатическим плевритом / **К.С. Титов**, Л.В. Демидов,

- М.В. Киселевский, И.Ж. Шубина, И.Н. Михайлова, Л.М. Родионова, К.Ю. Тополь, И.Е. Синельников, А.Н. Грицай // Российский онкологический журнал. — 2010. — № 4. — С. 20-24.
8. **Титов, К.С.** Внутриволостная биотерапия метастатических серозитов у больных с опухолями женской репродуктивной системы / **К.С. Титов**, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, А.К. Антонов, О.В. Титова, М.В. Киселевский // Паллиативная медицина и реабилитация. — 2010. — № 3. — С. 44-50.
 9. **Титов, К.С.** Внутриволостная биотерапия при опухолевых асцитах / **К.С. Титов**, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, А.К. Антонов, О.В. Титова, М.В. Киселевский // Паллиативная медицина и реабилитация. — 2010. — №4. — С. 30-34.
 10. **Титов, К.С.** Биотерапия опухолевых асцитов у больных раком яичников / **К.С. Титов**, А.Н. Грицай, М.В. Киселевский, В.Ю. Сельчук, Э.Х. Кучмезов, А.К. Антонов // Вопросы онкологии. — 2011. — № 4. — С. 470-473.
 11. **Титов, К.С.** Внутриволостная биотерапия с использованием интерлейкина-2 и донорских ЛАК-клеток при метастатических асцитах у больных раком яичников / **К.С. Титов**, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, Э.Х. Кучмезов // Российский биотерапевтический журнал. — 2011. — №2. — С. 51-54.
 12. **Титов, К.С.** Внутриволостная адоптивная иммунотерапия при метастатических асцитах у больных раком органов желудочно-кишечного тракта / **К.С. Титов**, М.В. Киселевский, В.Ю. Сельчук, И.Ж. Шубина, А.К. Антонов, А.В. Белоусов, Э.Х. Кучмезов // Паллиативная медицина и реабилитация. — 2011. — № 2. — С. 5-8.
 13. **Титов, К.С.** Внутриволостная иммунотерапия опухолевых перикардитов / **К.С. Титов**, М.В. Киселевский, В.Ю. Сельчук, А.Н. Грицай, Н.Ю. Анисимова // Сибирский медицинский журнал. — 2011. — № 5.— С. 47-52.
 14. Антонов, А.К. Лечение опухолевых перикардитов / А.К. Антонов, **К.С. Титов**, А.В. Белоусов, М.В. Киселевский // Вестник службы крови России. — 2011. — №2. — С. 27-29.

15. **Титов, К.С.** Роль клеточной биотерапии при внутриполостном лечении опухолевых асцитов у больных раком молочной железы и яичников / **К.С. Титов**, В.Ю. Сельчук, М.В. Киселевский, А.К. Антонов, Г.В. Титова, Л.М. Родионова // Вестник службы крови России. — № 1. — 2012. — С. 28-33.
16. **Титов, К.С.** Интраперитонеальная биотерапия у больных с асцитными формами диссеминированного рака яичников / **К.С. Титов**, А.Н. Грицай, Л.В. Демидов, Л.М. Родионова, М.В. Киселевский, М.В. Мосина // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2012. — №3-4. — С. 169-172.
17. Бычков, М.Б. Современные подходы к лечению больных с опухолевым плевритом, резистентным к системной терапии / М.Б. Бычков, **К.С. Титов**, В.А. Горбунова, Д.В. Филоненко, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский, Е.М. Трещалина // Российский онкологический журнал. — 2013. — № 3. — С.4-8.
18. **Титов, К.С.** Использование клеточных биотехнологий в лечение метастатических перикардитов у больных с опухолями женской репродуктивной системы / **К.С. Титов**, С.М. Волков, Л.В. Демидов, А.Н. Грицай, Н.И. Лазарева, М.В. Киселевский, А.П. Николаев // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2013. — № 3-4. — С. 101-104.
19. Шубина, И.Ж. Возможности иммунотерапии при раке яичников / И.Ж. Шубина, А.Н. Грицай, Л.Т. Мамедова, Н.Ю. Соколов, С.А. Кузнецов, М.В. Киселевский, Н.И. Лазарева, В.В. Кузнецов, **К.С. Титов**, А.П. Николаев // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2013. — № 3-4. — С. 110-113.
20. **Титов, К.С.** Технологии клеточной иммунотерапии в лечении больных со злокачественными новообразованиями / **К.С. Титов**, Л.В. Демидов, И.Ж. Шубина, В.А. Хайленко, М.В. Киселевский, А.С. Вихрова // Вестник РНИМУ им. Н.И. Пирогова. — 2014. — № 1. — С. 42-47.
21. **Титов, К.С.** Сравнение эффективности и переносимости внутрибрюшинной клеточной и ИЛ-2-иммунотерапии у больных с химиорезистентными асцитными формами рака желудка / **К.С. Титов**,

Л.В. Демидов, И.Ж. Шубина, М.В. Киселевский // Российский онкологический журнал. — 2014. — № 3.— С. 24-28.

22. **Титов, К.С.** Клиническая эффективность внутриполостной биотерапии у больных с опухолевыми серозитами / **К.С. Титов**, Л.В. Демидов, И.Ж. Шубина, А.Н. Грицай, А.В. Егорова, М.В. Киселевский. // Российский онкологический журнал. — 2015. — №2. — С. 8-12.

ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Титов, К.С.** Внутриполостная иммунотерапия опухолевых серозитов с использованием аллогенных лимфокин активированных киллеров / **К.С. Титов**, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, Е.А. Черемушкин, И.Ж.Шубина, Л.М.Родионова, И.Н.Михайлова // Эффективная фармакотерапия в онкологии, гематологии и радиологии. — 2006. — № 2. С.42-45.
2. **Titov, K.S.** Locoregional LAK therapy of cancer / I.N. Mikhailova, **K.S. Titov**, I.E. Sinelnikov, N.N. Petenko, E.A. Cheremushkin, I.Zh. Shubina // 8th International Symposium Biological Therapy of Cancer from Disease to Targeted Therapy. Dresden, Germany. — 2006. — Poster presentations. Abstract. — P. 134.
3. Shubina, I. Zh. Intrapleural IL-2/LAK Therapy of NSCLC Patients with Malignant Effusion / I. Zh. Shubina, S.M. Volkov, **K.S. Titov**, L.V. Demidov, M.V. Kiselevsky // The 2nd Russia-Japanese International Conference on Lung Cancer. Tokyo, Japan. — 2006. — Abstracts Book. — P. 14.
4. **Титов, К.С.** Возможности внутриплевральной иммунотерапии у больных с метастатическими плевритами / **К.С.Титов**, М.В. Киселевский, Л.В. Демидов, И.Ж. Шубина, И.Н. Михайлова, И.Е. Синельников, Л.М. Родионова // Российский биотерапевтический журнал. Материалы VIII всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва, 21-22 апреля 2009г. Тезисы докладов. — 2009. — № 2. — С. 65.
5. Биотерапия злокачественных опухолей / **К.С. Титов**. // Онкология для практикующих врачей. Учебное пособие / Под ред. С.С. Чистякова. — М.:

- Авторская Академия; Товарищество научных изданий КМК, 2009. — С. 50-63.
6. Шубина, И.Ж. Локорегионарная иммунотерапия опухолевых серозитов рекомбинантным интерлейкином-2 (Ронколейкин) / И.Ж. Шубина, **К.С. Титов**, И.Н. Михайлова, Л.В. Демидов, М.В. Киселевский // Российский биотерапевтический журнал. Материалы VIII всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва, 23-24 апреля 2010г. Тезисы докладов. — 2010. — № 1. — С. 48.
 7. Грицай, А.Н. Характер лейкоцитарной инфильтрации опухолей больных раком яичников / А.Н. Грицай, О.В. Лебединская, Н.Ю. Анисимова, М.В. Киселевский, И.Н. Кабановская, **К.С. Титов**, Д.А.Рябчиков, А.Ю. Кашурников // Справочник акушера-гинеколога. — 2011.— №1-2 — С. 23-27.
 8. **Титов, К.С.** Современное лечение опухолевых асцитов у больных раком яичников / К.С. Титов, А.Н. Грицай, М.В. Киселевский, А.Ю. Кашурников // Акушерство и гинекология. Наука и практика. — 2011. — № 3-4. — С. 36-41.
 9. Патогенез опухолевых серозитов: плевриты, асциты, перикардиты / В.Ю. Сельчук, Н.Ю. Анисимова, **К.С. Титов**, М.В. Киселевский // Опухолевые серозиты / Под ред. В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского. — М.: Практическая медицина, 2011. — С. 24-40.
 10. Основные принципы диагностики опухолевых серозитов / С.Б. Петерсон, Е.С. Вакурова, А.Н. Губин, А.Н. Грицай, **К.С. Титов** // Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты / Под ред. В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского. — М.: Практическая медицина, 2011. — С. 41-54.
 11. Тактика лечения опухолевых асцитов / В.Ю. Сельчук, Н.Ю. Анисимова, **К.С. Титов**, М.В. Киселевский // Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты / Под ред. В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского. — М.: Практическая медицина, 2011. — С. 134-144.

12. Лечение больных раком яичников, осложненных опухолевыми серозитами / К.П. Лактионов, А.Н. Грицай, Н.С. Кержковская, **К.С. Титов**, С.А. Швачко // Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты / Под ред. В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского. — М.: Практическая медицина, 2011.— С. 164-197.
13. Лечение опухолевых перикардитов / **К.С. Титов**, А.Н. Грицай, В.Ю. Сельчук, М.В. Киселевский // Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты / Под ред. В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского. — М.: Практическая медицина, 2011. — С. 226-232.
14. Иммунотерапия опухолевых серозитов / **К.С. Титов**, И.Ж. Шубина, С.М. Волков, Л.В. Демидов, И.Н. Михайлова, М.В. Киселевский // Опухолевые серозиты: плевриты, асциты, перикардиты / Под ред. В.Ю. Сельчука, М.Б. Бычкова, М.В. Киселевского. — М.: Практическая медицина, 2011. — С. 233-265
15. Zh. Shubina. Adoptive immunotherapy of malignant effusions / I. Zh. Shubina, **K.S. Titov**, I.O. Chikileva, L.V. Demidov, M.V. Kiselevsky // Malignant effusions. Pleurites, ascites, pericardites / M.V. Kiselevsky (eds.). — Springer, — 2012. — P. 99-122.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Аллоген.	— аллогенные
Аутол.	— аутологичные
БДУ	— без дополнительного уточнения
ВБХТ	— внутривнутрибрюшинная химиотерапия
ИИГХ	— интраоперационная интраперитонеальная гипертермическая химиоперфузия
ИЛ	— интерлейкин
ИНФ	— интерферон
КТ	— компьютерная томография
ЛАК	— лимфокин-активированные киллеры
МЛ	— моноклеарные лейкоциты
МПл	— мезотелиома плевры
МРТ	— магнитно-резонансная томография
МТТ	— (4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
НК	— натуральный киллер
НМРЛ	— немелкоклеточный рак легкого
НПО	— невыявленный первичный очаг
ОА	— опухолевый асцит
ОГК	— органы грудной клетки
ОИЛ	— опухоль инфильтрирующие лимфоциты
ОО	— объективный ответ
ОП	— опухолевый плеврит
ОПк	— опухолевый перикардит
ОС	— опухолевые серозиты
ПКС	— полная культуральная среда
ПМЗО	— первично-множественные злокачественные опухоли
ПО	— полный ответ
ПХТ	— полихимиотерапия
ПЭТ	— позитронно-эмиссионная томография
РЖ	— рак желудка
РЖКТ	— рак органов желудочно-кишечного тракта

РКС	— рабочая культуральная среда
РМЖ	— рак молочной железы
РОД	— разовая очаговая доза
РП	— рак почки
РПЖ	— рак поджелудочной железы
РТК	— рак толстой кишки
РЯ	— рак яичников
СОД	— суммарная очаговая доза
УЗИ	— ультразвуковое исследование
ФГА	— фитогемагглютинин
ФДТ	— фотодинамическая терапия
ФНО	— фактор некроза опухолей
ЧО	— частичный ответ
PBS	— фосфатно-солевой буфер
VPF	— фактор проницаемости сосудов
VEGF	— сосудистый эндотелиальный фактор роста
CD	— кластер дифференцировки