

УДК 616.11-006:615.37

*К.С. Титов, И.Ж. Шубина, С.М. Волков, Л.М. Родионова, М.В. Киселевский***БИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПЕРИКАРДИТОВ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Киселевский Михаил Валентинович, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-27-94**e-mail:** kisele@inbox.ru

Статья поступила 20.10.2009, принята к печати: 03.10.2009.

Резюме

В 1996–2006 гг. в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 23 пациентам по поводу метастатического экссудативного перикардита была проведена внутривнутриперикардальная иммунотерапия с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин» «Биотех», Россия) и аутологических ЛАК-клеток, генерированных из лимфоцитов перикардального экссудата больных. Внутривнутриперикардальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия у больных с метастатическим экссудативным перикардитом, показала высокую эффективность (95,7 %). Клинические эффекты ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии, обусловлены лизисом опухолевых клеток аутологичными лимфокин-активированными киллерами.

Ключевые слова: интерлейкин-2, ЛАК, опухолевый перикардит, иммунотерапия.*K.S. Titov, I.Zh. Shubina, S.M. Volkov, L.M. Rodionova, M.V. Kiselevsky***BIOETHERAPY OF MALIGNANT PERICARDITIS**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS

Abstract

23 patients underwent intra-pericardial immunotherapy of metastatic exudative pericarditis at the Institute of Clinical Oncology N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center from 1996 to 2006. The immunotherapy involved recombinant interleukin-2 ("Ronkoleukin", "BioTech", Russia) and autologous LAK-cells generated from lymphocytes of patients' pericardial effusion. Intra-pericardial IL-2/LAK immunotherapy in patients with metastatic exudative pericarditis showed high effectiveness (95,7 %). We suggest that the clinical effects of IL-2/LAK immunotherapy are determined by tumor cell lysis with autologous lymphokine activated killers.

Key words: interleukin-2, LAK, malignant pericarditis, immunotherapy.**Введение**

Одной из основных причин перикардитов (до 36%) являются метастазы злокачественных новообразований. Наиболее часто опухолевый перикардит возникает при раке легкого, что составляет примерно одну треть случаев, на втором месте следует РМЖ (25% случаев). Гемобластозы (15 % случаев) составляют третью по частоте группу больных с опухолевыми перикардитами [1; 5]. Злокачественный перикардальный выпот также наблюдается при злокачественной мезотелиоме, раке шейки матки и злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта [3; 10]. Опухолевый перикардит обычно возникает поздно и является следствием прогрессирования опухолевого процесса, поэтому редко манифестируется как первый признак онкологического заболевания. Эти пациенты, несмотря на плохой прогноз, нуждаются в лечении, поскольку почти в половине случаев перикардальный выпот может привести к тампонаде сердца [3; 7]. В настоящее время существует четыре основных метода лечения злокачественного перикардального выпота:

- перикардоцентез,
- внутривнутриперикардальная склеротерапия,
- системная химиотерапия, которая наиболее часто применяется для химиочувствительных опухолей,
- хирургическое лечение.

Выбор терапии обуславливают несколько факторов: общее состояние пациента, гемодинамические расстройства, доступность метода лечения, распространенность и гистологические особенности опухоли [5; 7; 9].

Основное показание к перикардоцентезу – угроза тампонады сердца, обусловленная накоплением жидкости в полости перикарда. Эта процедура имеет также важное диагностическое значение, особенно у пациентов без подтвержденного диагноза [2]. Больным с перикардальным выпотом проводится также перикардотомия, которая позволяет в ряде случаев предотвратить рецидивы [6; 10]. Данные о роли системной лекарственной терапии в лечении опухолевых перикардитов весьма ограничены, однако есть основания предлагать, что цитостатическая терапия может быть эффективной при химиочувствительных опухолях, например при лимфомах [7] и при раке молочной железы [3; 7; 10].

Несмотря на значительный опыт использования склерозирующих агентов в лечении злокачественных экссудатов, их применение у пациентов с опухолевыми перикардитами весьма ограничено [6]. Для инициации перикардального склероза использовались различные препараты, включая 5-фторурацил, блеомицин, митомицин С, тальк и радиоактивное золото.

Однако оценить эффективность трудно, потому что использование этих веществ было описано, как правило, в единичных случаях [4; 5; 6; 10].

Существует небольшое количество клинических исследований с использованием внутривнутриперикардiallyного введения цитокинов, прежде всего интерлейкина-2 и лимфокин-активированных киллерных клеток (ЛАК), выделенных из перикардiallyного экссудата больного. В частности, U. Toh [8] et al. на данных о 4 больных со злокачественным перикардiallyным выпотом была продемонстрирована клиническая эффективность и хорошая переносимость данного метода. Единственным побочным эффектом была лихорадка 1 степени (по шкале ВОЗ). Эти клинические результаты позволяют предположить, что внутривнутриперикардiallyная иммунотерапия может быть эффективна и безопасна при лечении опухолевых перикардитов.

Целью данного исследования являлась оценка клинической эффективности и безопасности применения внутривнутриперикардiallyной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии при опухолевых перикардитах.

Материалы и методы

В 1996–2006 гг. в НИИ Клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 23 пациентам по поводу метастатического экссудативного перикардита была проведена внутривнутриперикардiallyная иммунотерапия с использованием рекомбинантного интерлейкина-2 («Ронколейкин» «Биотех», Россия) и аутологичных ЛАК-клеток, генерированных их лимфоцитов перикардiallyного экссудата больных.

У 10 (43 %) больных перикардит был проявлением опухолевой диссеминации при немелкоклеточном раке легкого, у 9 (40 %) – при раке молочной железы и у 4 (17 %) был обусловлен прогрессированием рака яичников.

Исследуемая группа включала 14 женщин и 9 мужчин в возрасте от 35 до 70 лет, состояние которых к моменту проведения иммунотерапии у всех расценено как средней тяжести. До начала внутривнутриперикардiallyной иммунотерапии все пациенты получали соответствующее комбинированное или комплексное лечение, как правило – хирургическое в комбинации с химио-, гормоно- или радиотерапией.

Перед началом иммунотерапии из полости перикарда удалялось 300–1000 мл серозного, серозно-геморрагического или геморрагического экссудата. Во всех 23 случаях до проведения иммунотерапии выполнялось цитологическое исследование перикардiallyного выпота.

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

Генерированные из МЛ экссудативной жидкости и ресуспендированные в физиологическом растворе ЛАК-клетки вводили через установленный ка-

тетер в пораженную полость в дозе 110–150 млн. клеток (сумм. – 1 млрд. 100 млн. – 1 млрд. 500 млн. клеток) также на 1–5 и 8–9 сутки проводимого лечения. Контрольную эхокардиографию или УЗИ перикарда проводили после иммунотерапии, а также через 1 мес. и далее в динамике через каждые 3 месяца.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) из перикардiallyного выпота стабилизированного гепарином (25 ед/мл) проводили на градиенте фикола (Sigma, США, $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$), центрифугированием при 400 g в течение 30 минут. МЛ, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывались в среде 199 (ПанЭко, Москва). После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Полученные лимфоциты ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) в концентрации 500 000/мл и инкубировались с интерлейкином-2 (1000 МЕ/мл) («Ронколейкин», Биотех, Россия) при $t=37^\circ\text{C}$ и 5,0 % CO_2 в течение 3 суток для генерации ЛАК. Затем генерированные активированные лимфоциты использовали для внутривнутриперикардiallyного введения.

Определение экспрессии поверхностных антигенов МЛ и ЛАК проводили при помощи моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов. Результаты учитывали методом проточной цитофлюорометрии на цитометре FACScan (Becton Dickinson, США). Определяли уровень экспрессии дифференцировочных антигенов CD16; CD25, CD38, HLA-DR; молекул адгезии 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.

Результаты и обсуждение

Цитологическое исследование проводилось до начала внутривнутриперикардiallyной иммунотерапии, а также в конце лечения всем больным с перикардитами. В перикардiallyном выпоте до лечения выявлялось, как правило, значительное количество опухолевых клеток и небольшое количество зрелых лимфоцитов (2–3 в поле зрения). В конце лечения у большинства больных опухолевые клетки отсутствовали, в экссудате опухолевые клетки обнаруживались только у 1 пациента с аденокарциномой легкого, не ответившего на такое лечение. При проведении внутривнутриперикардiallyной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии полный эффект отмечен у 18 пациентов (78,1 %), частичный эффект (наличие небольшого количества жидкости в перикарде) у 4 (17,3 %). В 1 (4,3 %) случае зарегистрировано отсутствие эффекта.

Суммарная эффективность внутривнутриперикардiallyной ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапии составила 95,4%. Повторное накопление выпота в перикарде отмечено у 2 (8,6%) больных в сроки от 6 до 12 месяцев после лечения (см. табл.).

Таблица

Клиническая эффективность внутривнутриперикардiallyной иммунотерапии опухолевых перикардитов

Основной диагноз	n больных	Клинический эффект		
		Полный	Частичный	Без эффекта
Немелкоклеточный рак легкого	10 (43,5%)	7 (30,4%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)
Рак молочной железы	9 (39,1%)	9 (40,1%)	1 (4,3%)	0
Рак яичников	4 (17,4%)	2 (8,6%)	1 (4,3%)	0
Всего	23 (100%)	18 (78,1%)	4 (17,3%)	1 (4,3%)

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

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

Имунофенотип ЛАК, генерированных из МЛ перикардального экссудата при инкубации их *ex vivo* в присутствии ИЛ-2, характеризовался повышенной экспрессией антигена натуральных киллеров CD16 и активационных антигенов CD25, CD38, а также антигена главного комплекса гистосовместимости

II класса HLA-DR и молекулы адгезии CD58, по сравнению с уровнем экспрессии этих маркеров на интактных МЛ, выделенных из перикардального выпота (рис. 1-2).

Таким образом, внутриперикардальная ИЛ-2/ЛАК-иммунотерапия, у больных с метастатическим экссудативным перикардитом, показала высокую эффективность (95,7 %).

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

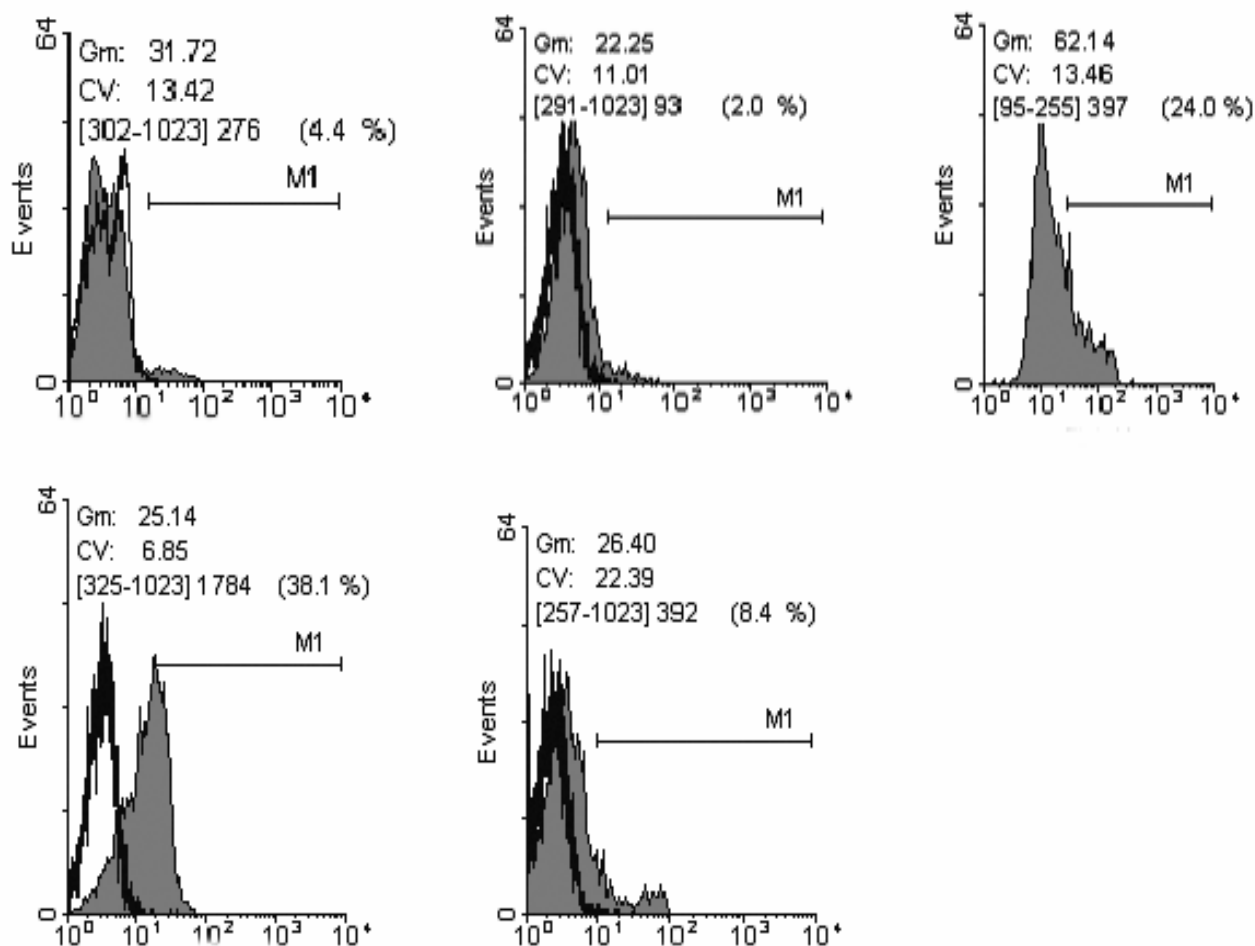


Рис. 1. Экспрессия поверхностных антигенов на лимфоцитах, выделенных из перикардального экссудата:

Ось X – боковое светорассеивание (усл. ед.), ось Y – прямое светорассеивание (усл. ед.). Гистограммы, отражающие уровни экспрессии поверхностных маркеров, меченых МКА:

CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены;

HLA-DR – молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса;

Gm – средне-геометрическая отклонение сигнала;

CV – коэффициент вариации;

в квадратных скобках – регистрирующиеся каналы, после квадратных скобок – средний канал, в круглых скобках процент клеток, экспрессирующих данный антиген; линия M1 – уровень значений отличных от контроля.

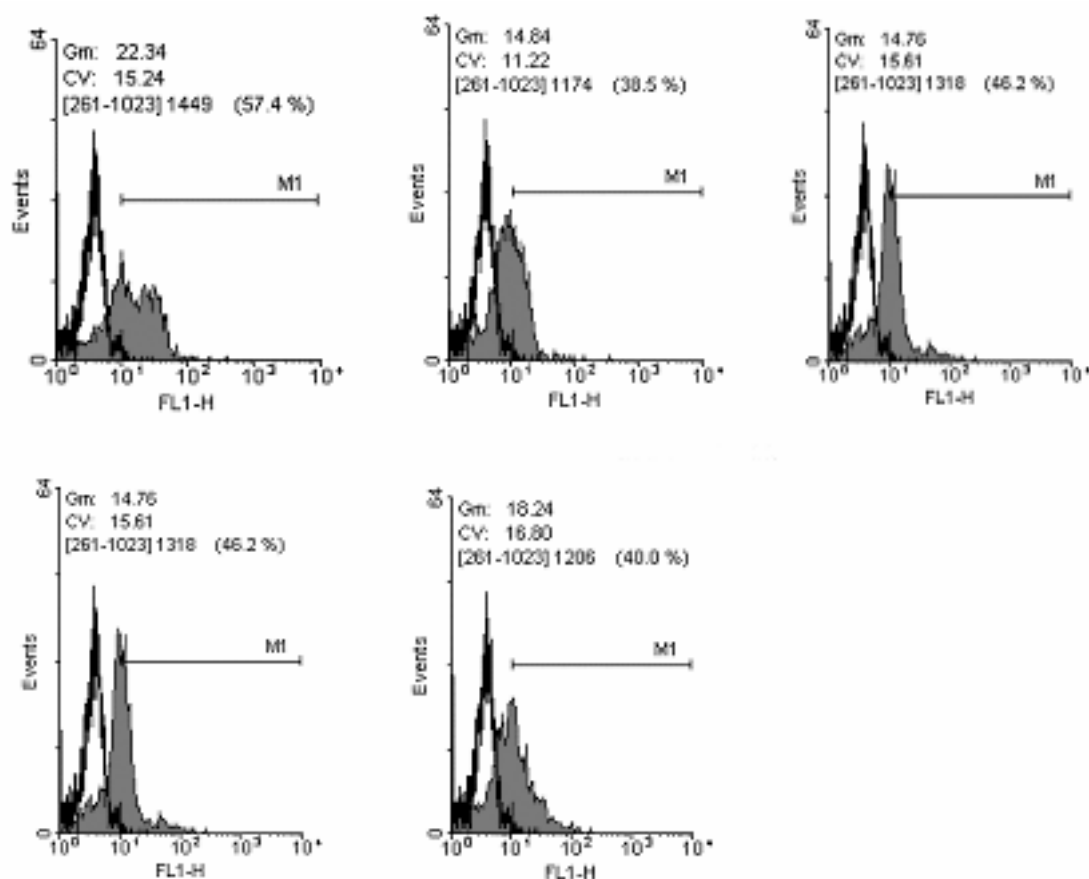


Рис. 2. Экспрессия поверхностных антигенов на лимфокин-активированных киллерах, генерированных из лимфоцитов, выделенных из перикардального экссудата.

Ось X – боковое светорассеивание (усл. ед.), ось Y – прямое светорассеивание (усл. ед.). Гистограммы, отражающие уровни экспрессии поверхностных маркеров, меченых МКА:

CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены;

HLA-DR – молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса;

Gm – средне-геометрическая отклонение сигнала;

CV – коэффициент вариации;

в квадратных скобках – регистрирующиеся каналы, после квадратных скобок – средний канал, в круглых скобках процент клеток, экспрессирующих данный антиген; линия MI – уровень значений отличных от контроля.

Литература

1. Buzaid A.C., Garewal H.S., Greenberg B.R. Managing malignant pericardial effusion // West J. Med. 1989. – Vol. 150(2). – P. 174–9.
2. Cornily J.C., Pennec P.Y., Castellat P. et al. Cardiac tamponade in medical patients: a 10-year follow-up survey // Cardiology. – 2008. – Vol. 111(3). – P. 197–201.
3. Kainuma S., Masai T., Yamauchi T. et al. Primary malignant pericardial mesothelioma presenting as pericardial constriction // Ann Thorac Cardiovasc Surg. – 2008. – Vol. 14(6). – P. 396–8.
4. Kaira K., Mor M. Intrapericardial Instillation of Mitomycin C in Recurrent Cardiac Tamponade due to Malignant Pericardial Effusion // Clinical Oncology. – 2006. – Vol. 18(6). – P. 506.
5. Keane D., Jackson G. Managing recurrent malignant pericardial effusions // BMJ. – 1992. – Vol. 305. – P. 729–30.
6. Lestuzzi C., Lafaras C., Bearz A. Malignant pericardial effusion: sclerotherapy or local chemotherapy? // British Journal of Cancer. – 2009. – Vol. 101. – P. 734–5.
7. Maisch B., Karatolos K. New possibilities of diagnostics and therapy of pericarditis. // Internist (Berl). – 2008. – Vol. 49(1). – P. 17–26.
8. Toh U., Fujii T., Seki N. et al. Characterization of IL-2-activated TILs and their use in intrapericardial immunotherapy in malignant pericardial effusion // Cancer Immunol Immunother. – 2006. – Vol. 55(10). – P. 1219–27.
9. Vaitkus P.T., Herrmann H.C., LeWinter M.M. Treatment of malignant pericardial effusion // JAMA. – 1994. – Vol. 272(1). – P. 59–64.
10. Verleye L., Thomakos N., Edmondson R.J. Recurrent cervical cancer presenting as malignant pericarditis: case report and review of the literature // Eur J Gynaecol Oncol. – 2009. – Vol. 30(2). – P. 193–5.