

УДК 618.19-006.6-033.2:57.088

L. V. Demidov, I. N. Mihailova, I. E. Cinelnikov, I. J. Shubina, E. A. Cheremushkin, A. R. Virshke, N. N. Petenko, E. V. Ogorodnikova, L. Yu. Arustamian, M. V. Kiselevsky

IL-2/LAK-THERAPY PROBLEMS IN CLINIC

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The review article on clinical effectiveness of IL-2/LAK-therapy considers main aspects of pharmacokinetics and pharmacodynamics of the therapy active agents. We suggest essential principals for enhancement of this treatment clinical efficiency on the basis of the analyzed data.

Although preclinical studies on IL2/LAK-therapy have demonstrated beneficial results, so far clinical trials have failed to show significant clinical effectiveness. We consider that clinical ineffectiveness could be a result of inappropriate implication of this method due to: (a) lack of information about LAK-cells biodistribution in the organism at the time when most clinical studies were carried out, (b) the data on LAK-cells mechanism of action was not considered, (c) necessary doses and ways of administration of LAK-cells were not developed.

While studies on these issues were still under investigation on experimental models, clinical trials were conducted as well and thus failed to consider preclinical data that might be a plausible cause of inconsistency of clinical trials. Therefore it might not be possible to realize IL-2/LAK-therapy potential in clinical practice for a certain historical period.

The paper reviews different data on experimental research and previous results of clinical studies on IL-2/LAK-therapy, which confirm the higher efficacy of locoregional high dose IL-2/LAK-therapy. We consider it necessary to continue further clinical studies on this treatment mode in cancer patients.

The research also includes several case reports of IL-2/LAK-therapy in cancer patients carried out in N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS.

Key words: adoptive immunotherapy, interleukin-2, lymphokine-activated killer cells, locoregional immunotherapy.

Л. В. Демидов, И. Н. Михайлова, И. Е. Синельников, И. Ж. Шубина, Е. А. Черемушкин, Э. Р. Вишке, Н. Н. Петенко, Е. В. Огородникова, Л. Ю. Арустамян, М. В. Киселевский

ПРОБЛЕМЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ИЛ-2/ЛАК-ТЕРАПИИ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

В обзорной статье, посвященной проблемам клинической эффективности ИЛ-2/ЛАК-терапии рассматриваются основные аспекты фармакокинетики и фармакодинамики данного вида терапии, на основании которых сделаны выводы о возможных путях повышения клинической эффективности этого вида лечения онкологических больных.

В статье показано, что, несмотря на хорошие результаты преклинических исследований, в клиниках так и не удалось получить высокой эффективности ИЛ-2/ЛАК-терапии. По мнению авторов, это объясняется тем, что в период, когда проводилась большая часть клинических исследований, не было сведений о распределении вводимых ЛАК-клеток в организме, не были учтены данные о механизмах действия ЛАК, не существовало разработок о должных дозах и методах доставки в организм больного ЛАК-клеток. Исследования этих вопросов проводились в экспериментальных лабораториях одновременно с клиническими исследованиями, в связи с чем не были учтены при проведении этих клинических исследований. Таким образом, потенциальный эффект ИЛ-2/ЛАК-терапии не мог быть реализован в клинической практике на протяжении определенного исторического периода.

В статье приведены эти, разрозненные в литературе, экспериментальные данные, а также исторические сведения по ЛАК-терапии, на основании которых обоснована необходимость локорегионарного применения высокодозной ИЛ-2/ЛАК-терапии и сделан вывод о необходимости проведения дополнительных клинических исследований данного вида терапии.

Описаны также клинические случаи применения ИЛ-2/ЛАК-терапии у онкологических больных в отделении биотерапии опухолей РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Ключевые слова: адаптивная иммунотерапия, интерлейкин-2, лимфокин-активированные киллерные клетки, локорегионарная иммунотерапия.

История исследований роли иммунной системы в противоопухолевой защите организма насчитывает около 40 лет. Многочисленные исследования, проведенные в течение этого периода, показали, что важная роль в этой защите отведена клеточному звену иммунитета, представленному в организме человека и животных рядом эффекторных клеток. Среди этого ряда особый интерес традиционно вызывали НК-клетки, относящиеся к лимфоидным клеткам, но отличающиеся фенотипически от Т- и В-лимфоцитов [1].

Особая роль НК в противоопухолевом иммунитете подтверждена как способностью этих клеток лизировать опухолевые клетки *in vitro*, так и подтвержденной корреляцией между количественным уровнем этих клеток в организме и его способностью развивать противоопухолевую защиту. В частности, наблюдения за мышами инбредных линий показали, что различные линии этих животных характеризуются различными количественными уровнями НК. У мышей с высоким уровнем НК спонтанные или индуцированные опухоли встречаются редко, у мышей с низким уровнем частота спонтанных опухолей, наоборот, высокая. Трансплантация клеток от линий мышей с высоким уровнем НК линиям с низким уровнем этих клеток в эксперименте повышает резистентность реципиентов к некоторым формам опухолей [1].

Следует отметить, что одной из особенностей НК-клеток является присутствие на их поверхности киллингибирующего рецептора (KIR) [3]. Он распознает антигены главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС-I), представленные практически на всех нормальных клетках организма, и останавливает лизис клетки-мишени. Опухолевые клетки могут отличаться от нормальных отсутствием или снижением экспрессии антигенов МНС, и тогда такие клетки становятся мишенями для НК. Если на опухолевых клетках экспрессируется МНС-I и уровень этой экспрессии нормальный, лизис НК-клеткой такой опухолевой клетки будет, вероятно, невозможен.

Изучение активности клеток лимфоидного ряда под воздействием различных цитокинов показало, что важную роль в активности как Т-лимфоцитов, так и НК-клеток играет интерлейкин-2 (ИЛ-2) — активный компонент фактора роста Т-клеток (ФРТК). В 1980 г. Угон и соавт. опубликовали сообщение о том, что в культуре нормальных спленоцитов мыши, содержащей ФРТК, генерируются клетки, способные лизировать свежeweделенные или культивируемые клетки сингенной саркомы. В дальнейшем эти результаты были подтверждены в опытах на мышax и лимфоцитах человека, и описанное явление получило название ЛАК-феномена, определяемого как лизис свежeweделенных или культивированных опухолей *in vitro* лим-

фоидными клетками, активированными в культуре ИЛ-2. ЛАК-клетки отличаются от НК-клеток, присутствующих в образцах свежeweделенной лимфоидной ткани, как фенотипически, так и своей способностью лизировать свежeweделенные НК-резистентные опухолевые клетки-мишени [8].

Изучение ЛАК-феномена быстро перешло из лабораторий в клинику — попытки использовать ЛАК-клетки в качестве терапевтического агента в лечении рака стали предприниматься Национальным онкологическим институтом США (NCI) уже с 1980–1981 гг. [7]. За 20 лет изучения феномена использовались как аутологичные, так и аллогенные ЛАК-клетки, ЛАК-клетки с различными фенотипами, инкубированные в течение разных сроков, предпринимались попытки использования для индукции активности различных цитокинов, изучались особенности опухолей, лизирующихся при воздействии ЛАК-клеток, использовались различные дозы и режимы введения ЛАК-клеток при различных опухолях и так далее.

Данные клинических исследований показали, что ЛАК-феномен, продемонстрировавший высокую противоопухолевую активность в преclinical исследованиях *in vitro* и *in vivo* на животных [8], впоследствии не оправдал возложенных на него надежд в лечении онкологических заболеваний человека. Многочисленные клинические исследования, проводимые на протяжении более чем 20 лет, показали, что эффективность системного применения ЛАК-клеток в отношении таких опухолей, как меланома и рак почки, не превышает эффективности стандартных методов лечения [11, 14, 18, 24, 29]. Несмотря на разочаровывающие результаты применения ИЛ-2/ЛАК-терапии, на фоне всех неудач были отмечены отдельные успехи при применении ЛАК-клеток в локорегионарном режиме, в частности, при метастатических поражениях печени и легких [4, 20, 21, 32, 36, 37]. Также была отмечена эффективность данной терапии в лечении опухолевых плевритов при введении ИЛ-2/ЛАК в плевральную полость [6]. Традиционно эту, относительно более высокую, эффективность связывают с тем, что локорегионарное применение ЛАК-клеток позволяет добиться более высокой концентрации ЛАК-клеток в области опухоли [4, 20]. Тем не менее результаты применения локорегионарной терапии, так же как и системной, невозможно считать удовлетворительными, поскольку нет достаточно убедительных, статистически достоверных данных, свидетельствующих о постоянстве достигаемого в некоторых исследованиях противоопухолевого эффекта данной терапии. Имеются сообщения, в которых отмечены неудовлетворительные результаты данного вида терапии [30]. Однако наличие отдельных успехов в применении ИЛ-

2/ЛАК-терапии стимулировало интерес к изучению закономерностей распределения ЛАК-клеток *in vivo* с целью выяснения причин относительной эффективности локорегионарной терапии.

Следует отметить, что еще на ранних стадиях пре-клинических исследований, проводимых в 80-х годах XX в., было отмечено, что *in vivo* в противоопухолевой эффективности ЛАК-терапии решающее значение имеет не иммуногенность опухоли, а локализация опухолевых очагов у животных, на которых проводилось исследование. В большинстве случаев проводимая терапия оказывалась эффективна при сочетании системного и внутрибрюшинного путей введения в тех случаях, когда локализация опухолевых процессов наблюдалась в легких и печени [8]. Следствием этого наблюдения явились исследования, направленные на изучение накопления вводимых ЛАК-клеток в опухолевой ткани различных органных локализаций.

Согласно данным Cohen и соавт. (1987), последовательно бравших биоптаты из доступных метастазов опухоли у пациентов, которые проходили курс лечения ИЛ-2/ЛАК-терапии в системном режиме, в составе опухолевого биоптата относительно редко появляются клетки маркерного фенотипа ЛАК. Таким образом, эти работы показывают, что при системном введении лишь очень незначительная часть клеток достигает опухоли-мишени [2]. В 1991 г. P. Basse и соавт. исследуют меченные флюоресцирующим соединением НК-клетки и устанавливают, что спустя некоторое время после введения они способны накапливаться в 10-кратных концентрациях в ткани метастазов в легких и печени [2].

В 1999 г. J. Kjaergaard и соавт. публикуют исследование «Биораспределение и опухолевая локализация лимфокинактированных Т-киллеров в зависимости от пути их введения животным-опухоленосителям» [17]. Целью данного исследования являлось изучение особенностей распределения Т-ЛАК-клеток в живом организме при различных путях введения через определенные промежутки времени. Клетки Т-ЛАК помечались ^{125}I -dU или флюоресцирующей краской

(TRITC) и вводились внутривенным, внутрисердечным, внутрипортальным и внутриперитонеальным путями нормальным (C57BL/6) мышам или мышам с сингенными 7–12-дневными B16 меланомными метастазами в различные органы. Общее биораспределение Т-ЛАК клеток замерялось путем регистрации гамма-излучения, а опухолевая локализация — флюоресцентной микроскопией.

Данное исследование продемонстрировало, что накопление меченых Т-ЛАК-клеток в органных метастазах прямо зависит от пути введения клеток в организм. При внутривенном введении интенсивность накопления ЛАК-клеток в метастазах, расположенных в легких, была в 5 раз интенсивней, чем в окружающей легочной ткани, и составляла 1200 клеток на 1 мм³. В метастазах и здоровой ткани других органов накопления ЛАК-клеток при данном пути введения практически не наблюдалось. Напротив, при внутрипортальном введении наибольшее накопление ЛАК-клеток отмечалось именно в печени (до 1400 ЛАК-клеток на 1 мм³ в портальной области и до 500 клеток на 1 мм³ в метастазах), а в легких и других органах ЛАК-клетки не определялись. При внутрисердечном (левожелудочковом) введении ЛАК-клеток отмечалось незначительное их накопление в тканях надпочечников (до 200 ЛАК-клеток на 1 мм³), а при внутриперитонеальном введении было установлено, что ЛАК-клетки накапливаются в тех метастазах, которые не отделены от вводимых ЛАК-клеток тканью брюшины (табл. 1). Исследователи делают вывод, что на пути ЛАК-клеток существуют практически непреодолимые препятствия в микроциркуляторном русле таких органов, как печень и легкие. Изучение механизма данного явления не входило в задачи исследования.

Таким образом, накопление ЛАК-клеток в области метастазов различных органов детерминировано путем их введения: в зависимости от того, какой путь введения применялся — внутрипортальный или внутривенный, клетки будут накапливаться соответственно в печени или легких, т. е. внутривенный путь введения можно рассматривать как локорегионарный для легких.

Таблица 1

Накопление Т-ЛАК-клеток (количество клеток на 1 мм² ткани) в тканях органов при различных способах введения ($p < 0,001$) (по J. Kjaergaard et al.)

Орган-мишень Путь введения	Легкие		Печень		Надпочечники	
	Паренхима	Метастазы	Портальная зона	Метастазы	Паренхима коры	Метастазы
Внутривенный	До 200	До 1200	До 50	Около 0	До 100	До 100
Внутрипортальный	До 50	До 200	До 1400	До 500	Около 0	Около 0
Внутрисердечный	До 200	До 250	До 500	Около 0	До 200	До 200
Внутрибрюшинный	Около 0					

Следует отметить, что несмотря на то что ЛАК-клетки накапливаются в метастазах печени и легких при соответствующих путях введения, их концентрация для осуществления лизиса опухоли, по всей видимости, недостаточна. Количество клеток, которое следует считать необходимым для лизиса опухоли, неизвестно, однако, согласно мнению ряда авторов, для реализации противоопухолевого эффекта необходимо соотношение ЛАК-клеток к клеткам опухоли порядка 5:1–100:1 [4, 20]. По данным же J. Kjaergaard, в проведенном эксперименте максимально достигнутая концентрация составляет около 1400 ЛАК-клеток на 1 мм². Таким образом, можно предположить, что эффективность ИЛ-2/ЛАК-терапии зависит не только от пути введения, но и от количества вводимых ЛАК-клеток и величины опухолевой массы. Кроме того, при избытке опухолевых клеток возможна обратная ситуация. В лаборатории молекулярной иммуногенетики рака Института биологии гена РАН было проведено исследование секретируемых линией К-562 белков, в котором было показано, что при избытке опухолевых клеток они лизируют лимфоциты, используя для этого набор цитотоксических белков, родственных TNF- α . В системах, в которых наблюдался лизис лимфоцитов, в проведенных экспериментах соотношение трансформированные клетки/лимфоциты составляло 20:1 [9].

Приведенные данные и выводы согласуются с результатами отдельных клинических исследований, продемонстрировавших эффективность локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии в адъювантном и лечебном режимах при метастатических поражениях легких и печени.

М. Kobari и соавт. в 2000 г. публикуют результаты небольшого клинического исследования по адъювантной локорегионарной терапии метастазов рака поджелудочной железы в печень [21]. 29 пациентов с раком поджелудочной железы III и IV стадии (по Japan Pancreas Society) были разделены на 2 группы; в обеих группах проводилась радикальная резекция рака поджелудочной железы и интраоперационная радиотерапия; в исследуемой группе дополнительно проводилась внутривенная ИЛ-2/ЛАК-терапия. Обе группы сравнивали впоследствии по выживаемости и частоте возникновения метастазов в печени. Спустя 3 года в опытной группе ($n=12$) выживших было 36 % ($n=4$), в контрольной ($n=17$) — 0 %, результат статистически недостоверен ($p=0,082$). Частота возникновения метастазов в печень была достоверно ниже в опытной группе, чем в контрольной: 2 из 12 против 10 из 15 ($p<0,05$).

Н. Kimura и соавт. в 1997 г. опубликовали результаты 9-летнего рандомизированного исследования эффективности ИЛ-2/ЛАК-терапии совместно с химио- или радиотерапией после радикального или паллиативного оперативного вмешательства при первичной карциноме легкого III фазы [20]. Больные ($n=174$) были разделены по форме заболевания на курабельных и incurable и рандомизированы в группы, получающие ИЛ-2/ЛАК-терапию (группа А) и стандартное

лечение (группа В). Больным в курабельной группе проводилась радикальная резекция опухоли легкого, в incurable — паллиативная резекция, в обеих группах было стандартное лечение, а затем в экспериментальной группе А осуществлялась длительная ИЛ-2/ЛАК-терапия.

Схема лечения, с некоторыми вариациями для различных больных, была следующей:

1. Радикальное или паллиативное оперативное вмешательство.

2. Стандартная химиотерапия (минимум 2 курса):

— цисплатин (80 мг/м²) в 1-й день;

— виндезин (3 мг/м²) в 1-й, 8-й день;

— митомицин (8 мг/м²) 1-й день.

3. Лучевая терапия: 40–60 Гр на область поражения (лимфатические узлы, грудная стенка, перикард, бронхиальная культя и т. д.).

4. ИЛ-2/ЛАК-терапия (для группы А):

1) Rn-ЛАК 2 курса, 1–5 млрд на курс;

2) Pb-ЛАК каждые 2–3 мес. на протяжении 2 лет.

Анализ результатов исследования показал достоверное увеличение выживаемости в экспериментальной группе как для курабельных, так и для некурабельных больных (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение эффективности в экспериментальной и контрольной группах в III фазе рандомизированного исследования эффективности ИЛ-2/ЛАК-терапии совместно с химио- или радиотерапией после радикального или паллиативного оперативного вмешательства при немелкоклеточном раке легкого

	Экспериментальная группа (полихимио-, лучевая, ИЛ-2/ЛАК-терапия), % $n=82$		Контрольная группа (полихимио-, лучевая терапия), % $n=88$	
	5-летняя выживаемость	9-летняя выживаемость	5-летняя выживаемость	9-летняя выживаемость
Группа после радикальной резекции ($p<0,001$)	65,5 $\pm$ 10,2		40,6	27,0
	(n=33)		(n=36)	
Группа после паллиативной резекции ($p<0,001$)	40,3		20,8	
	(n=49)		(n=52)	
Общая выживаемость ($p<0,001$)	54,4	52	33,4	24,2
Средняя продолжительность жизни	Не достигнута		2,4 года	

Выводы, сделанные авторами данного исследования, включают:

1. Необходимость предварительной хирургической, лучевой и химиотерапевтической циторедукции опухоли, обусловленная тем, что добиться необходимой концентрации ЛАК-клеток в области опухоли достаточно сложно и чем меньше масса опухоли, тем вероятней такую концентрацию создать.

2. Кроме того, высказывается предположение, что эффективность ЛАК-терапии также зависит от иммуносупрессивных факторов, выделяемых опухолью,

способности химиотерапии индуцировать экспрессию Fas-антигена, узнаваемого ЛАК-клетками, гетерогенности опухоли.

3. Увеличение продолжительности жизни больных несомненно не является заслугой ИЛ-2/ЛАК-терапии, но комплексного применения всех перечисленных выше методов лечения, взаимодействие между которыми еще должно быть изучено.

Подобные результаты были получены также и другими исследователями [32, 36] при изучении эффективности адоптивной локорегионарной иммунотерапии в лечебном или адъювантном режиме при раке пищевода [37], рецидивирующих глиобlastомах [10], опухолевых плевритах [6], гепатоцеллюлярном раке (табл. 3) и др. [4].

Исследователи, получившие эффект от данной терапии, также отмечают необходимость применения высоких доз вводимых ЛАК-клеток, длительного режима терапии и максимальной предварительной циторедукции опухолевой массы с целью достижения оптимального соотношения ЛАК-клетки/опухолевые клетки [28].

Следующий трудноразрешимый вопрос, связанный с проблемами эффективности ЛАК-терапии, заключается в механизме узнавания опухолевой клетки клеткой-киллером и ее лизиса. Это узнавание может быть или не быть связанным с представлением на поверхности клетки-мишени чужеродных антигенов в комплексе с молекулами белков I класса МНС [1]. Согласно классическим представлениям, в иммунологии цитотоксические лимфоциты лизируют клетки, имеющие на своей поверхности такие комплексы, а лизис, осуществляемый НК-клетками, не связан с МНС-I, т. к. НК-клетки экспрессируют KIR, блокирующий лизис клетки-мишени при наличии на ее поверхности аутологичного МНС [1, 3].

Выяснение фенотипа, присущего ЛАК-клеткам, проводится уже довольно давно. Некоторые авторы склонны полагать, что наибольшую цитотоксичность проявляют выделенные и очищенные ЛАК-клетки, со-

ответствующие фенотипу НК. Данные ЛАКи в литературе носят название А-НК-ЛАК-клетки [2, 10, 12, 13, 31]. Другие авторы приписывают цитотоксический эффект Т-лимфоцитам. ЛАК-клетки, получаемые, к примеру, из периферических лимфатических узлов и имеющие фенотип цитотоксических лимфоцитов (CTL), носят название Т-ЛАК-клетки или Rn-LAK [20]. Третьи полагают, что ЛАК-феномен опосредован взаимодействием сразу нескольких популяций иммунокомпетентных клеток с различными фенотипами [8, 12, 33]. Ряд исследователей обходят эту проблему, применяя в клинике одновременно ЛАК-клетки 2 популяций — А-НК и Т-ЛАК [20]. Также существуют подходы инкубирования ЛАК-клеток фенотипа CTL совместно с клетками опухолевой ткани пациента [37].

Не исключено, что фенотип ЛАК-клеток является донорспецифичным. В исследовании, проведенном I. Vollenweider, было показано, что от разных доноров при равных условиях выделяются ЛАК-клетки различных фенотипов, обладающие также неодинаковым уровнем цитотоксичности [16].

Традиционно считается, что фенотипически ЛАК-клетки представляют собой НК-подобные клетки [2, 8], цитотоксический эффект которых не опосредован представлением чужеродных антигенов в комплексе с белками МНС-I. Для определения цитотоксичности ЛАК-клеток используется тест на клеточной линии К-562 [5], отличительной особенностью которой является отсутствие экспрессии МНС-I. Таким образом, если фенотип ЛАК-клеток подобен фенотипу НК, их цитотоксический эффект может быть выражен только в отношении опухолей, на которых снижена или отсутствует экспрессия молекул I класса МНС. Однако существует мнение, что экспрессия МНС-I на клетках опухоли может осуществляться с различной интенсивностью: согласно данным, полученным в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей А. Ю. Барышникова (НИИ ЭДТО РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН), из 18 исследуемых линий мела-

Таблица 3

Результаты адоптивной адъювантной иммунотерапии, по данным ряда авторов [15]

Автор	Критерий отбора	Лечебный протокол	Размер образца (Tx/Ctl)	Время наблюдения	DFS Tx vs Ctl	OS Tx vs Ctl	Заключение
Une [38]	Нет	A ia vs A+LAK and IL-2 ia	24(12/12)	Нет	50 % vs 8,3 %	Нет	Эффект положительный
Kawata [19]	Нет	A ia vs A +IL-2+LAK ia	24(12/12)	Нет	NS	Нет	Нет эффекта
Lygidakis [27]	Нет	No Tx vs	40(20/20)	Нет	Рецидив	Нет	Эффект положительный
		Химиоиммунотерапия			0/18 vs 7/17		
Takayama [34]	Полное удаление	LAK IV на 2-й неделе	155 (76/79)	>5 лет	3 года	5 лет	Эффект положительный
	Отсутствие клеток	3, 4, 12, 24-я неделя			48 % vs 33 %	68 % vs 62 %	
	По краю разреза	После операции			5 лет 37 % vs 22 %		

Примечание: ia — внутриартериально; iv — внутривенно; NA — данные недоступны; NS — незначительно; DFS — безрецидивной промежуток; OS — общая выживаемость; Tx — лечение; Ctl — контроль; LAK — ЛАК-клетки.

номы человека лишь на одной из них экспрессия МНС-I практически отсутствует, на одной — снижена до 57 %, а на остальных составляет 80–99 %. Таким образом, предполагаемая эффективность ЛАК-клеток, если их фенотип аналогичен фенотипу NK и их цитотоксичность ограничена уровнем экспрессии МНС-I, в отношении данных линий должна быть низка. Это также подтверждается цитотоксическими тестами в отношении линий с разным уровнем экспрессии МНС-I, проведенными в лаборатории клеточного иммунитета ЭДиТО; в данных экспериментах наибольшая цитотоксичность ЛАК-клеток зарегистрирована в отношении линий с отсутствием экспрессии МНС-I или низким ее уровнем.

Однако это не согласуется с данными об успехах локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии. В частности, было показано, что при опухолевых плевритах эффективность введения ЛАК-клеток в плевральную полость составляет около 90 % [6]. Экспрессия МНС-I на опухолевых клетках в данном исследовании не определялась, однако можно предположить, что вряд ли она была близкой к 0 % у всех пациентов.

Эти факты гипотетически могут свидетельствовать о том, что фенотип ЛАК не аналогичен фенотипу NK-клеток и что цитотоксичность ЛАК-клеток может быть не ограничена МНС-I [26] ни в плане представления антигена, ни в плане торможения киллинга через KIR. Возможно также, что цитотоксичность ЛАК-клеток зависит от еще каких-либо факторов, в настоящий момент не известных.

В любом случае в связи с вышеизложенным представляется необходимым фенотипирование используемых ЛАК-клеток, а также выяснение наличия корреляции между их цитотоксичностью и экспрессией на уже фенотипированных опухолевых клеточных линиях тех или иных антигенов.

Помимо этого, несомненно, важную роль в осуществлении противоопухолевого эффекта играют другие свойства опухоли: выраженность экспрессии сигнальных молекул, молекул адгезии, целого ряда ферментов, которые могут не экспрессироваться вообще или экспрессироваться в недостаточном количестве для осуществления контакта между киллером и мишенью. Также, возможно, имеют значение факторы, выделяемые опухолью, — иммуносупрессивные и др. [9, 22, 23, 25, 39].

Суммируя все вышесказанное, а также выводы различных исследователей, можно предположить, что для повышения эффективности ИЛ-2/ЛАК-терапии необходимо учитывать следующее:

1. Органные метастазы должны быть доступны для ЛАК-клеток, что возможно при локорегиональном применении.

2. Количество вводимых ЛАК-клеток должно быть адекватным с точки зрения соотношения ЛАК/опухолевые клетки, что обеспечивается высокими дозами вводимых ЛАК-клеток, длительным режимом их введения и максимальной предварительной циторедукцией опухолевой ткани.

3. Циторедукция опухолевой ткани осуществима в связи с возможной продукцией опухолью иммуносупрессивных факторов.

4. Комплексное применение различных методов лечения представляется целесообразным также с позиций возможной гетерогенности опухоли и перекрестных механизмов действий различных химио- и иммунотерапевтических агентов при их сочетанном применении.

5. Необходимо предварительно определять фенотип применяемых ЛАК-клеток и их функциональную активность в отношении разных по своим характеристикам опухолевых линий. В последующем это позволит проанализировать цитотоксичность тех или иных фенотипов ЛАКов в отношении опухолевых клеток с известными фенотипическими характеристиками.

Учитывая данные выводы, в РОНЦ РАМН им. Н. Н. Блохина отделением биотерапии опухолей совместно с лабораторией клеточного иммунитета ЭДиТО РАМН, отделениями опухолей печени и поджелудочной железы, рентгенодиагностическим отделением, отделением переливания крови, отделом клинической иммунологии создан протокол клинических исследований локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии метастатических поражений печени при диссеминированной меланоме и колоректальном раке. В настоящее время идет отбор больных на данный протокол. Планируется проведение локорегионарной ЛАК-терапии фенотипированными ЛАК-клетками с предварительным определением цитотоксичности используемых клеток в отношении опухолевых линий с известным уровнем экспрессии МНС-I и определением той же экспрессии в опухоли пациента.

В завершение хотелось бы привести собственный опыт применения локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии в отделении биотерапии опухолей РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. К настоящему моменту в отделении данная терапия проводилась 4 больным: 2 — в режиме монотерапии, 2 — в составе комплексной терапии с химиопрепаратами. Данных, полученных от этих больных, разумеется, недостаточно для какого-либо анализа, но, на наш взгляд, эти примеры могут показаться интересными аудитории, изучающей проблемы ИЛ-2/ЛАК-терапии.

Для получения ЛАК-клеток использовали аллогенные лейкоциты цельной крови здоровых рандомизированных доноров, совместимой по групповой и резусной принадлежности с кровью пациента. Для забора крови использовали системы встроенных пластиковых катетеров типа «Гемакон» фирмы Baxter. Лейкотромбоцитарный слой (ЛТС) выделяли из дозы (450 мл) консервированной донорской крови путем дифференцированного фракционирования на рефрижераторной центрифуге при $G=2857$ в течение 15 мин при температуре 18 °С. Сепарированный ЛТС объемом 50 мл перемещали в отдельный пластиковый контейнер в стерильных условиях.

При проведении локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии в 1-й день в условиях кабинета ангиографии осу-

ществлялась катетеризация общей печеночной артерии с установкой катетера на 4–5 сут. В течение последующих 4–5 дней 1 раз в сутки через установленный катетер вводились ЛАК-клетки, инкубированные в соответствии с описанной выше методикой в лаборатории клеточного иммунитета ЭДнТО РОНЦ. Разовые и суммарные дозы вводимых ЛАК-клеток не были стандартизованы и составляли: разовые — 100–450 млн, суммарные — от 500 млн до 1 млрд ЛАК-клеток. На 5-е сутки катетер удалялся. На 3-и и 5-е сутки системно вводился рекомбинантный ИЛ-2 (препарат ронколейкин) в дозе 1 млн МЕ в виде 2-часовой инфузии.

1. Пациентка, 43 лет, с клиническим диагнозом: меланома кожи передней брюшной стенки. Состояние после хирургического лечения в 1996 г.: метастазы в паховые лимфатические узлы справа; состояние после хирургического лечения в августе и октябре 2003 г. по поводу рецидива: метастазы в печень, легкие; состояние в процессе биохимиотерапии.

Из анамнеза: в 1996 г. больной иссекли опухоль передней брюшной стенки, гистологически верифицирована меланома. С 1996 по 2003 г. больная наблюдалась в онкологической клинике по месту жительства, наблюдение включало регулярное УЗИ органов брюшной полости, забрюшинного пространства, малого таза и периферических лимфатических узлов 1 раз в полгода, а также рентгенографию грудной клетки 1 раз в год. В течение указанного периода данных за прогрессирование заболевания не выявлено. В 2003 г. у больной выявлены метастазы в паховые лимфатические узлы справа, произведена операция Дюкена в марте 2003 г. В октябре 2003 г. — рецидив, произведена повторная операция Дюкена справа. В ноябре 2003 г. у больной выявлены метастазы в печень: в S_{VI} 2,6×2,0 см, в S_{VII} 2,2×1,8 см, в S_{VIII} 4,0×3,5 см. Также, по данным РКТ, выявлены 2 очага в легких размером 0,1 и 0,3 см, судить о характере которых не представлялось возможным.

Больная поступила в отделение биотерапии опухолей РОНЦ РАМН, где в период с ноября 2003 г. по январь 2004 г. ей было проведено 3 курса ПХТ по схеме CVD. Первоначально предполагалось, что после курсов CVD больной будет назначена терапия реафероном, однако вследствие побочных эффектов химиотерапии (лейко/нейтропения IV степени) проведение интерферон-2 α -терапии оказалось невозможным. В течение этого периода по данным контрольных исследований не выявлялось признаков прогрессирования заболевания, состояние больной было оценено как стабилизация опухолевого процесса. В связи с этим было принято решение модифицировать ПХТ локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапией. Учитывая наличие неverifiedируемых очагов в легких, локорегионарную ИЛ-2/ЛАК-терапию решено дополнить системной.

В феврале и марте 2004 г. больной проведено 2 курса терапии по модифицированной схеме. При этом локорегионарная ИЛ-2/ЛАК-терапия была выполнена в полном объеме (вводилось около 1 млрд клеток за курс), а системная была ограничена вследствие побоч-

ных эффектов, возникших у больной. В апреле 2004 г. при контрольном обследовании очаги в печени определяются прежних размеров, однако крайне нечетко. В легких — без динамики.

В связи с неоднозначностью картины по данным РКТ и УЗКТ больной проведена ПЭТ, по которой очагов неопластического метаболизма не выявлено. В легких трактовка очагов по-прежнему затруднена по данным как РКТ, так и ПЭТ вследствие недостаточной разрешающей способности методов исследования.

Принято решение о проведении очередного курса по той же, измененной, схеме, однако курс не удалось провести по техническим причинам.

В июне 2004 г. при контрольном исследовании по данным РКТ очаги в печени не определяются, в легких — множественные метастазы до 0,6 см в диаметре. Больной изменена схема лечения.

2. Пациентка, 62 лет, с клиническим диагнозом: меланома хориоидеи $T_3M_0N_0$. Состояние после лучевого лечения в 2002 г.: прогрессирование, метастазы в печень; состояние в процессе иммунотерапии.

Из анамнеза: у больной, которой в 2002 г. был проведен курс протонной терапии по поводу меланомы хориоидеи, в феврале 2004 г. выявлены множественные метастазы в печень. Больная отказалась от проведения химиотерапии, и ей была предложена локорегионарная ИЛ-2/ЛАК-терапия в монорежиме.

С марта по май 2004 г. было проведено 3 курса локорегионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии. По данным контрольных исследований отмечена отрицательная динамика (табл. 4).

В связи с наличием признаков прогрессирования заболевания больной изменена схема лечения.

Таблица 4
Динамика изменения размеров метастазов в печени у пациентки на фоне проведения ИЛ-2/ЛАК-терапии в лечебном режиме

Доля	Март 2004 г. (до 1-го курса)	Апрель 2004 г. (1 курс)	Май 2004 г. (2 курса)	Июнь 2004 г. (3 курса)
Правая, см	Множественные, до 2,0	Множественные, до 2,3	Множественные, до 2,7	Множественные, до 3,7
Левая, см	3,7×1,6	2,3×1,9	1,8×1,5	2 метастаза до 2,8×2,0

3. Пациент, 36 лет, с клиническим диагнозом: метастазы рака толстой кишки в печень и забрюшинные лимфатические узлы.

Из анамнеза: в ноябре 2002 г. больному выполнена левосторонняя гемиколэктомия по поводу рака толстой кишки. В процессе операции выявлены множественные метастазы в печень, в обеих долях до 3,5 см. В декабре 2002 г. проведена химиоэмболизация в общую печеночную артерию. В январе 2003 г. выполнены правосторонняя гемигепатэктомия и термоабляция оставшихся очагов в левой доле. В феврале 2003 г.

проведен курс локорегионарной химиотерапии лейко-
ворином и 5-фторурацилом. В марте 2003 г. по данным
МРТ в левой доле печени определяются 5 очагов до
5,3 см в диаметре. По данным ПЭТ — очаги неоплас-
тического метаболизма в печени.

С марта по август 2003 г. больному проведено 12
курсов ПХТ оксалиплатином и 5-фторурацилом.
По данным контрольных обследований — положитель-
ная динамика. МРТ: в печени сохраняются 4 очага от
0,2 до 1,7 см; ПЭТ: исчезновение очагов неопластичес-
кого метаболизма. Решено прекратить химиотерапию.

По настоятельной просьбе больного с учетом целе-
сообразности продолжения противоопухолевого лече-
ния в отделении биотерапии опухолей РОНЦ РАМН
было предложено лечение по схеме локорегионарной
ИЛ-2/ЛАК-терапии, в октябре 2003 г. проведен 1-й курс
(920 млн ЛАК-клеток). При контрольном МРТ-исследо-
вании — положительная динамика, в печени определя-
ется один очаг 1,4×0,7 см. В декабре 2003 г. проведен 2-й
курс, при контрольном МРТ-исследовании убедитель-
ных данных за очаговые поражения печени не получе-
но. 3-й и 4-й курсы проведены в феврале и апреле
2004 г. В июне 2004 г. при контрольном обследовании
признаков прогрессирования не выявлено. Лечение бы-
ло прекращено по техническим причинам — невозмож-
ности осуществления катетеризации вследствие обли-
терации и спазма общей печеночной артерии.

4. Пациентка, 39 лет, с диагнозом: меланома кожи
анального канала. Состояние после хирургического
лечения в 2001 г.: метастазы в печень, параректальные
лимфатические узлы; состояние после иммунотера-
пии: прогрессирование.

Из анамнеза: в июле 2001 г. пациентке иссечена ме-
ланома анального канала, в декабре 2003 г. выявлены ме-
тастазы в параректальные лимфатические узлы и еди-
ничный метастаз в печень размером 2,0×1,7 см. Больная
отказалась от хирургического и химиотерапевтического
лечения, и ей было предложено лечение по схеме локо-
регионарной ИЛ-2/ЛАК-терапии в монорежиме.

В декабре 2003 г. проведен курс ИЛ-2/ЛАК-тера-
пии, введено 1,47 млрд ЛАК-клеток.

При контрольном обследовании выявлены увели-
чение ранее описанного очага в печени до 2,5×1,8 см
и появление 2 новых очагов до 1,3 см. Также отмечено
дальнейшее увеличение параректальных лимфатичес-
ких узлов.

В связи с наличием признаков прогрессирования
заболевания лечение по данной схеме прекращено,
больная переведена на другую схему.

Резюмируя описанные выше клинические случаи,
можно предположить, что в отдельных ситуациях ло-
корегионарная ИЛ-2/ЛАК-терапия может оказывать
определенный эффект на течение заболевания при ме-
тастатических поражениях печени. Однако, по нашему
мнению, делать какие-либо выводы об эффективности
данной терапии по столь небольшому опыту прежде-
временно. Необходимо проведение дальнейших работ
согласно созданной в РОНЦ РАМН программе экспе-

риментальных и клинических исследований ИЛ-
2/ЛАК-терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галактионов В. Г. Иммунология. — М.: Изд-
во МГУ, 1998. — С. 351–352.
2. Голфарб Р. Х. Антиметастатическая терапия.
В кн.: Биологические методы лечения онкологических
заболеваний / Под ред. Т. ДеВита, С. Хеллмана, С. Ро-
зенберга. — М.: Медицина, 2002. — С. 878–887.
3. Игнатов П. Е. Иммулитет и инфекция. — М.:
Время, 2002. — 69 с.
4. Киселевский М. В. Адоптивная иммунотера-
пия при злокачественных новообразованиях // Вест-
ник РАМН. — 2003. — № 3. — С. 40–44.
5. Киселевский М. В., Казанова Г. В., Варфоломе-
ева С. Р. и др. Опыт применения интерлейкина-2
и лимфокинактированных клеток-киллеров в тера-
пии онкогематологических заболеваний у детей // Им-
мунология. — 2002. — № 1. — С. 56–59.
6. Оразгельдыев К. Р. Внутривлепральная имму-
нотерапия опухолевых плевритов: Дис... канд. мед. на-
ук. — М., 2001.
7. Розенберг С. А. Адоптивная иммунотерапия:
клиническое применение. В кн.: Биологические мето-
ды лечения онкологических заболеваний / Под ред.
Т. ДеВита, С. Хеллмана, С. Розенберга. — М.: Меди-
цина, 2002. — С. 505–522.
8. Тополиан С. Л. Адоптивная клеточная тера-
пия: преклинические исследования. В кн.: Биологиче-
ские методы лечения онкологических заболеваний /
Под ред. Т. ДеВита, С. Хеллмана, С. Розенберга. — М.:
Медицина, 2002. — С. 484–503.
9. Яшин Д. В. Сравнительная характеристика ци-
тотоксических белков и апоптотических процессов
в клетках лимфоидной и нелимфоидной природы:
Дис... канд. биол. наук. — М., 2004.
10. Boiardi A., Silvani A., Ruffini P. A. et al. Loco-
regional immunotherapy with recombinant interleukin-2
and adherent lymphokine-activated killer cells (A-LAK)
in recurrent glioblastoma patients // Cancer Immunol.
Immunother. — 1994. — Vol. 39, No. 3. — P. 193–197.
11. Dillman R. O., Oldham R. K., Tauer K. W. et al.
Continuous interleukin-2 and lymphokine-activated killer
cells for advanced cancer // J. Clin. Oncol. — Vol. 9. — P.
1233–1240.
12. Fu-Sheng Wang, Ming-Xu Liu, Bing Zhang et al.
Antitumor activities of human autologous cytokine-
induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcino-
ma cells in vitro and in vivo // Division of Biological
Engineering, Beijing Institute of Infectious Diseases. —
Beijing. — P. 100039.
13. Hagensaars M., Zwaveling S., Kuppen P. J. et al.
Characteristics of tumor infiltration by adoptively transferred
and endogenous natural-killer cells in a syngeneic rat model:
implications for the mechanism behind anti-tumor responses
// Int. J. Cancer. — 1998. — Vol. 78(6). — P. 783–789.
14. Hoffman D. M., Gitlitz B. J., Belldegrun A.,
Figlin R. A. Adoptive cellular therapy // Division of

Hematology/Oncology. — University of California, Los Angeles School of Medicine, Johnson Comprehensive Cancer Center. — P. 90095–7059.

15. *Hui-Chuan Sun, Zhao-You Tang.* Preventive treatments for recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma — A literature review of randomized control trials // Liver Cancer Institute and Zhong Shan Hospital, Fudan University, Shanghai. — P. 200032.

16. *Vollenweider I., Moser R., Groscurth P.* Development of four donor-specific phenotypes in human long-term lymphokine-activated killer cell cultures // Cancer Immunol. Immunother. — Vol. 39, No. 5. — P. 305–312.

17. *Kjaergaard J., Marianne E.* et al. Biodistribution ens tumor localization of lymphokine-activated killer T cells following different routes of administration into tumor-bearing animals // Cancer Immunol. Immunother. — 2000. — Vol. 48. — P. 550–560.

18. *Kammula U. S., Marincola F. M.* Cancer Immunotherapy: Is There Real Progress at Last? // BioDrugs. — Vol. 11, No. 4. — P. 249–260.

19. *Kawata A., Une Y., Hosokawa M.* et al. Adjuvant chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma patients. Adriamycin, interleukin-2, and lymphokine-activated killer cells versus adriamycin alone // Am. J. Clin. Oncol. — 1995. — Vol. 18. — P. 257–262.

20. *Kimura H., Yamaguchi Y.* A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or noncurative resection of primary lung carcinoma // Cancer. — 1997. — Vol. 80(1). — P. 42–49.

21. *Kobari M., Egawa S., Shibuya K.* et al. Effect of intraportal adoptive immunotherapy on liver metastases after resection of pancreatic cancer // Br. J. Surg. — 2000. — Vol. 87(1). — P. 43–48.

22. *Komatsu F., Ishiguro K.* Lymphokine-Activated Killer Cells Can Kill Target Cells Not Only by Early Killing But Also by Late Killing, and the Late Killing Level Against Autotumor Cell Line // Oncol. Res. — 2003. — Vol. 13, No. 4. — P. 235–241.

23. *Komatsu F., Masuda T.* Cell-Cell Adhesion-Independent Killing Due to Lymphokine-Activated Killer Cells Against Glioblastoma Cell Lines // Oncol. Res. — 2003 — Vol. 12, No. 9. — P. 371–381.

24. *Koretz M. J., Lawson D. H., York R. M.* et al. Randomized study of interleukin 2 (IL-2) alone vs IL-2 plus lymphokine-activated killer cells for treatment of melanoma and renal cell cancer // Arch. Surg. — 1991. — Vol. 126, No. 7. — P. 37.

25. *Kwak J.-Y., Han M. K., Choi K.-S.* et al. Cytokines Secreted by Lymphokine-Activated Killer Cells Induce Endogenous Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis in DLD-1 Colon Cancer Cells // Cell. Immunol. — 2003. — Vol. 203, No. 2. — P. 84–94.

26. *Metelitsa L. S., Naidenko O. V., Kant A.* et al. Human NKT Cells Mediate Antitumor Cytotoxicity Directly by Recognizing Target Cell CD1d with Bound Ligand or Indirectly by Producing IL-2 to Activate NK Cells // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 3114–3122.

27. *Lygidakis N. J., Pothoulakis J., Konstantinidou A. E., Spanos H.* Hepatocellular carcinoma: surgica resection versus surgical resection combined with pre- and post-operative locoregional immunotherapy-chemotherapy. A prospective randomized study // Anticancer Res. — 1995. — Vol. 15. — P. 543–550.

28. *Ostanin A. A., Chernykh H. R., Leplina O. Y.* et al. IL-2-Activated Killer Cells and Native Cytokines in Treatment of Patients with Advanced Cancer // Russ. J. Immunol. — 1997. — No. 3–4. — P. 167–176.

29. *Rosenberg S. A., Lotze M. T., Yang J. C.* et al. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer // J. Nat. Cancer Inst. — 1993. — Vol. 85(13). — P. 1091.

30. *Sato T.* Locoregional immuno(bio)therapy for liver metastases // Semin. Oncol. — 2002. — Vol. 29(2). — P. 160–167.

31. *Schwarz R. E., Vujanovic N. L., Hiserodt J. C.* Enhanced antimetastatic activity of lymphokine-activated killer cells purified and expanded by their adherence to plastic // Cancer Res. — 1989. — March 1. — P. 1441–1446.

32. *Semino C., Martini L., Queirolo P.* et al. Adoptive immunotherapy of advanced solid tumors: an eight year clinical experience // Anticancer Res. — 1999. — Vol. 19(6C). — P. 5645–5649.

33. *Shohei Koyama.* Augmented human-tumor-cytolytic activity of peripheral blood lymphocytes and cells from a mixed lymphocyte/tumor culture activated by interleukin-12 plus interleukin-2, and the phenotypic characterization of the cells in patients with advanced carcinoma // J. Cancer Res. Clin. Oncol. — 1997. — Vol. 123, No. 9. — P. 478–484.

34. *Takayama T., Sekine T., Makuuchi M.* et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial // Lancet. — 2000. — Vol. 356. — P. 802–807.

35. *Teichmann J. V., Ludwig W. D., Thiel E.* Susceptibility of human leukemia to allogeneic and autologous lymphokine-activated killer cell activity: analysis of 252 samples // Nat. Immun. — 1992. — Vol. 11(3). — P. 117–132.

36. *Ueda Y., Sonoyama T., Itoi H.* et al. Locoregional adoptive immunotherapy using LAK cells and IL-2 against liver metastases from digestive tract cancer // Gan To Kagaku Ryoho. — 2000. — Vol. 27(12). — P. 1962–1965.

37. *Uhi Toh, Hideaki Yamana, Susumu Sueyoshi* et al. Locoregional Cellular Immunotherapy for Patients with Advanced Esophageal Cancer // Clin. Cancer Res. — 2000. — Vol. 6. — P. 4663–4673.

38. *Une Y., Kawata A., Uchino J.* Adopted immunochemotherapy using IL-2 and spleen LAK cell-randomized study // Nippon Geka Gakkai Zasshi. — 1991. — Vol. 92. — P. 1330–1333.

39. *Zhonghua Zhong, Liu Za Zhi.* Some immune functions of patients with carcinoma // 1994. — Vol. 16(6). — P. 415–418.