

Ю.А. Гриневич
Ф.В. Фильчаков
В.Л. Ганул
И.И. Смоланка

АДОПТИВНАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Украинский НИИ онкологии
и радиологии МЗ Украины,
Киев, Украина

Ключевые слова: рак легкого,
адоптивная иммунотерапия,
 $\alpha 2b$ -интерферон, Тактивин,
выживаемость.

Резюме. Изучена клиническая эффективность адоптивной иммунотерапии (АИТ) больных раком легкого (РЛ) с проведением на разных этапах лечения неспецифической активной иммунотерапии и введением генерированных в системе *in vitro* аутологичных противоопухолевых активированных лимфоцитов. Лечение 24 больных РЛ по данному протоколу привело к улучшению некоторых показателей состояния иммунной системы в ранние сроки. АИТ хорошо переносится больными и приводит к объективному уменьшению количества послеоперационных осложнений. Отмечена позитивная тенденция к улучшению отдаленных результатов лечения при использовании АИТ, особенно при распространенных формах РЛ с метастазами в регионарных лимфоузлах.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при иммунотерапии больных с солидными опухолями чаще всего используют лимфокинактированные киллерные клетки (ЛАК) [1, 2]. Повышение противоопухолевой резистентности при этом связывают с генерацией специфической цитотоксической активности лимфоцитов [3]. Однако использование ЛАК в терапии больных онкологического профиля имеет ряд существенных недостатков. Метод требует переноса большого количества аутологичных лимфоцитов и параллельного введения высоких доз интерлейкина-2 (ИЛ-2), вызывающих токсические осложнения.

В связи с этим интенсивно ведутся поиски возможности повышения противоопухолевой эффективности адоптивной иммунотерапии (АИТ) путем индукции специфического иммунного ответа, опосредованного цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), сенсibilизированными специфическими опухолевыми антигенами [4]. Возможность индукции у больных онкологического профиля противоопухолевой активности лимфоцитов в системе *in vitro* после их активации аутологичными опухолевыми клетками (ОК) [5] послужила основанием для разработки технологии генерации специфических цитотоксических клеток из популяции лимфоцитов регионарных лимфатических узлов (ЛУ) [6]. Адоптивный перенос таких активированных *in vitro* лимфоидных клеток (АЛК) больным раком легкого (РЛ) не вызывал каких-либо осложнений и приводил к нормализации некоторых иммунологических показателей в динамике обследования [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния АИТ на эффективность хирургического лечения больных РЛ.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

АИТ проведена 24 больным РЛ: I стадии — у 2, II стадии — у 6, III стадии — у 16. Плоскоклеточ-

ный РЛ был у 14, железистый — у 6, недифференцированный — у 4 пациентов. Радикальная операция выполнена 23 больным: 15 — пневмонэктомия, 8 — лоб- или билобэктомия. Одному больному выполнена паллиативная нижняя билобэктомия.

Результаты лечения с применением АИТ сравнивали с результатами только хирургического лечения 55 больных: 28 — выполнена пневмонэктомия, 27 — лоб- или билобэктомия. Заболевание I стадии было у 13, II стадии — у 5, III стадии — у 37 больных; плоскоклеточный рак диагностирован у 37, железистый — у 14, недифференцированный — у 4 больных. При помощи статистической обработки основных показателей, характеризующих прогноз и выживаемость (возраст, стадия заболевания, гистологическая форма опухоли и объем оперативного вмешательства), было установлено, что сравниваемые группы больных идентичны.

Анализ показателей продолжительности безрецидивного периода и выживаемости больных после лечения проводили с помощью метода вариационной статистики, используя динамичный (актуриальный) метод.

Нами изложен детально метод получения АЛК в системе *in vitro* [6]. Для индукции специфической, по отношению к аутологичной опухоли, цитотоксической активности лимфоцитов была использована модель, в которой приобретение цитотоксичности клетками происходит *in vivo* в результате роста опухоли с последующей стимуляцией лимфоцитов живыми аутологичными ОК в присутствии низких концентраций рекомбинантного ИЛ-2 в системе *in vitro*. В качестве источника лимфоцитов были использованы регионарные ЛУ. Суспензию ОК получали по методу [8]. ОК обрабатывали митомицином С («Serva», Германия) в конечной концентрации 25 мкг/мл в течение 30 мин при температуре 37 °С. Затем клетки трижды отмывали охлажденной средой RPMI-1640, центрифугировали при

400 г в течение 10 мин. Совместное культивирование ОК и лимфоцитов ЛУ проводили в соотношении 1:30 в вибрационном биореакторе при соотношении рабочего объема к объему реактора 7:10, температуре 37 °С с поверхностной аэрацией культуральной жидкости 0,2 л/мин и частоте виброперемешивания 1,5 Гц [6].

В работе использовали препарат рекомбинантного ИЛ-2 (МНТК «Биоген», Латвия) в концентрации 100 ЕД/мл, который вносили в культуральную среду на 2-е и 5-е сутки культивирования суспензии клеток. В качестве иммунокорректирующих средств на этапах лечения были использованы препарат тимического происхождения — Тактивин и человеческий рекомбинантный $\alpha 2b$ -интерферон (ИФН) — Лаферон («Биофарма», Украина).

Протокол проведения АИТ больным РЛ включал четыре этапа: 1 — инициация активности эффекторных клеток *in vivo*; 2 — операция; 3 — иммунокоррекция с помощью Тактивина и Лаферона

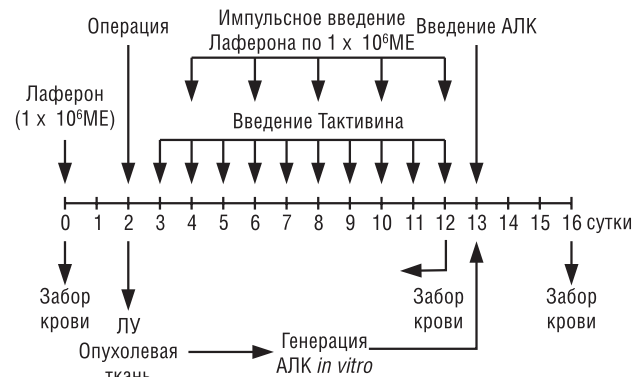


Рис. 1. Схема проведения АИТ больным РЛ

на; 4 — введение больным генерированных в системе *in vitro* ЛАК (рис. 1).

Лечение начинали с индукторной фазы, которая основана на инициации активности эффекторных клеток иммунной системы эндогенными факторами, продуцируемыми Т-лимфоцитами после введения ИФН [9]. Лаферон вводили в дозе $1 \cdot 10^6$ МЕ внутримышечно за 48 ч до операции (1-й этап).

После операции (2-й этап) в целях иммунокоррекции больным РЛ вводили Лаферон по $1 \cdot 10^6$ МЕ внутримышечно с интервалом 48 ч (суммарная доза $5 \cdot 10^6$ МЕ) и Тактивин по 1 мл ежедневно внутримышечно (суммарная доза — 10 мл) (3-й этап).

На 9–11-е сутки после операции больным внутривенно вводили в растворе Рингера аутологичные лимфоциты с индуцированной *in vitro* противоопухолевой цитотоксической активностью (4-й этап). Количество введенных АЛК в среднем составляло $1,74 \cdot 10^8$ и зависело от массы тела пациента.

Эффективность АИТ оценивали по непосредственным и ближайшим результатам лечения больных и по динамике изменений показателей иммунной системы. Иммунологические исследо-

вания проводили до лечения, после иммунокоррекции и на 3-и–4-е сутки после введения АЛК.

Эндокринную функцию тимуса оценивали по титру тимического сывороточного фактора (ТСФ) [10]. Количественную оценку основных популяций лимфоцитов в крови проводили по результатам реакции спонтанного розеткообразования [11].

Цитотоксическую активность лимфоцитов периферической крови изучали с помощью МТТ-теста [12]. В качестве клеток-мишеней использовали клетки линии К-562. Уровень цитотоксической активности лимфоцитов характеризовался величиной индекса цитотоксичности (ИЦ). Реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) в присутствии ФГА проводили с использованием гепаринизированной цельной крови [11]. Окислительный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов крови (НСТ-тест) исследовали микрометодом [13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента, функций описательной статистики и t-теста с разными дисперсиями для определения достоверности случайных различий (p).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований обнаружено, что иммунокорректирующая терапия, проведенная в послеоперационный период, не приводит к статистически значимым изменениям иммунологических показателей по сравнению с таковыми до лечения (см. таблицу). Вместе с тем, выбранная схема неспецифической активной иммунотерапии, на наш взгляд, оправдана, поскольку в результате ее

Таблица
Изменение показателей иммунной системы больных РЛ при проведении АИТ

| Показатель | До лечения | После иммунокоррекции | После введения аутологичных АЛК |
|--|-----------------|-----------------------|---------------------------------|
| Количество Т-лимфоцитов ($\cdot 10^9/л$) | $0,82 \pm 0,11$ | $0,71 \pm 0,17$ | $0,6 \pm 0,07$ |
| Количество В-лимфоцитов ($\cdot 10^9/л$) | $0,10 \pm 0,01$ | $0,16 \pm 0,08$ | $0,09 \pm 0,01$ |
| Количество БГЛ ($\cdot 10^9/л$) | $0,15 \pm 0,07$ | $0,48 \pm 0,25$ | $0,4 \pm 0,16$ |
| ТСФ (\log_2 титра) | $3,4 \pm 0,6$ | $3,2 \pm 0,4$ | $4,6 \pm 0,5$ |
| НСТ-тест (ИС, %) | 126 ± 13 | 156 ± 27 | $293 \pm 35^*$ |
| РТМЛ (ИТМ, %) | 142 ± 15 | 109 ± 20 | $91 \pm 7^*$ |
| ИЦ, % | $23,5 \pm 2$ | $21,5 \pm 1,5$ | $33,3 \pm 2,1^*$ |

* Различия при сравнении с величинами до лечения статистически достоверны ($p < 0,05$).

проведения не усугубилась иммуносупрессия, характерная для послеоперационного периода у больных этой категории. Данная схема иммунокоррекции направлена на восстановление нарушенных функций иммунной системы за счет эндогенной продукции интерлейкинов в ответ на введение препаратов тимического происхождения и ИФН [14], что, по нашему мнению, является важным условием для функционирования естественных и опухолеспецифических клеток-киллеров.

Последующее введение больным активированных *in vitro* аутологичных лимфоцитов приводит к усилению метаболической активности нейтро-

фильных гранулоцитов (индекс стимуляции $293 \pm 35\%$ против $126 \pm 13\%$ до лечения) и цитотоксичности лимфоцитов (ИЦ $33,3 \pm 2,1\%$ против $23,5 \pm 2,0\%$ до лечения). К позитивным результатам проведенной АИТ можно отнести и статистически значимое снижение показателя индекса миграции лейкоцитов ($p < 0,05$). Если до лечения лимфоциты больных были анергичны в ответ на стандартную дозу митогена (индекс миграции — $142 \pm 15\%$), то после терапии лимфоциты больных отвечают на митоген выработкой фактора, ингибирующего миграцию лейкоцитов (индекс стимуляции $91 \pm 7\%$). Проведенная терапия вызывает усиление выработки ТСФ, что может быть объективным признаком восстановления иммунной системы этих больных (см. таблицу).

В процессе проведения АИТ мы наблюдали побочные реакции в виде повышения температуры тела до 38°C у 3 больных и аллергическую реакцию в виде высыпаний на коже у 1 пациента, которую удалось купировать в течение суток с помощью антигистаминных препаратов. Послеоперационных гнойно-септических осложнений у больных этой группы не было, в то время как у больных, подвергшихся только хирургическому лечению, эти осложнения наблюдали в 10,9% случаев. Следовательно, иммунотерапия, проведенная больным РЛ в сочетании с хирургическим лечением, предотвращает развитие послеоперационных гнойно-септических осложнений, вероятно, вследствие усиления функциональной активности иммунной системы в целом.

Известно, что около 50% больных РЛ умирают в первые 2 года после радикальной операции вследствие рецидивов и метастазов опухоли. Это послужило основанием для сравнительного анализа 2-летней выживаемости больных РЛ после хирургического и комбинированного лечения с включением АИТ (рис. 2).

Двухлетняя выживаемость радикально оперированных больных РЛ после проведенной АИТ составила: в целом — $87,5 \pm 6,75\%$; при отсутствии метастазов в регионарных ЛУ — $90,91 \pm 8,67\%$; при наличии метастазов в регионарных ЛУ — $84,62 \pm 10,01\%$. В группе больных, подвергшихся

хирургическому лечению без АИТ, выживаемость составила $50,22 \pm 2,78\%$; $59,77 \pm 3,37\%$ и $32,71 \pm 4,46\%$ соответственно. Хотя число наблюдений в данном исследовании невелико, достоверное повышение выживаемости, несомненно, обусловлено включением в курс лечения АИТ.

Таким образом, проведенная по разработанному нами протоколу АИТ больных РЛ с использованием на разных этапах лечения неспецифической активной иммунотерапии и адаптивного переноса генерированных в системе *in vitro* АЛК привела к улучшению некоторых показателей иммунной системы в ранние сроки. АИТ хорошо переносится больными, не усложняет течение послеоперационного периода, приводит к объективному уменьшению количества послеоперационных осложнений. Отмечена позитивная тенденция к улучшению отдаленных результатов лечения при использовании АИТ, особенно при распространенных формах РЛ с метастазами в регионарных ЛУ, что делает метод перспективным для дальнейшего совершенствования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Возианов АФ, Бутенко АК, Зак КП. Цитокины: биологические и противоопухолевые свойства. Киев: Наук думка, 1998. 313 с.
2. Бережная НМ, Горещкий БА. Интерлейкин-2 и злокачественные новообразования. Киев: Наук думка, 1992. 176 с.
3. Останин АА, Леплина ОЮ, Шевела ЕЯ и др. Изменение иммунологических показателей у онкологических больных при проведении адаптивной иммунотерапии. Иммунология 1996; (1): 29–31.
4. Darrow TL, Slingluff CL, Seiger HF. Autologous lymph node cell-derived tumor-specific cytotoxic T-cells for use in adoptive immunotherapy of human melanoma. Cancer 1988; 62: 84–91.
5. Fujimoto S. Specific immunotherapy against cancer using CTL. Science Technology in Japan 1989; 8: 80–3.
6. Гриневич Ю, Фильчаков Ф, Думанский В и др. Разработка систем культивирования человеческих цитотоксических лимфоцитов. Укр журн мед техніки і технол 1998; (3): 23–8.
7. Фильчаков ФВ, Иваненко ВК, Думанский ВД и др. Технология генерации цитотоксических Т-лимфоцитов для адаптивной иммунотерапии онкологических больных. В: Тезисы I съезда онкологов стран СНГ. Москва, 1996; Ч I: 191.

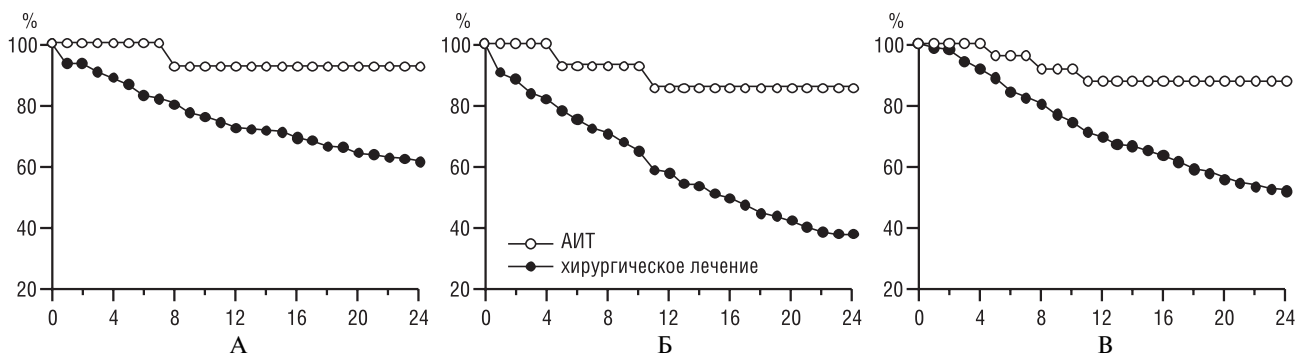


Рис. 2. Влияние АИТ на показатель 2-летней выживаемости больных РЛ
А — N0 M0; Б — N1–2 M0; В — N0–2 M0.

8. Сергеева НС, Свиридова ИК, Мороз ИА. Получение опухолевых клеток из тканей рака легкого человека с целью клонирования. Лаб дело 1991; (2): 28–30.

9. Патент 25354 А, А61К35125. Спосіб одержання імуномодулювальної речовини / Ф. Фільчаков, І. Фільчаков, Ю. Гриневич, В. Іваненко, В. Думанський, В. Борисов. (Україна). — № 96030806; Заявлено 01.03.96; Опубл. 30.10.98.

10. **Bach J F, Dardenne M.** Studies of thymic products. II. Demonstration and characterization of circulating thymic hormone. *Immunology* 1973; **25**: 353–66.

11. **Гриневич ЮА, Каменец ЛЯ.** Основы клинической иммунологии опухолей. Киев: Здоров'я, 1996. 160 с.

12. **Фильчаков ФВ, Малиновская ТП, Гриневич ЮА, Близнюк ИА.** Микроскопический вариант метода определения цитотоксической активности лимфоцитов. Лаб диагностика 1998; (1): 28–30.

13. **Miller F, Rollag H, Froland J.** Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. *APMIS* 1989; **97**: 490–6.

14. **Фильчаков ФВ, Фильчаков ИВ, Ганова ЛА и др.** Влияние тимуса на активацию интерфероном выработки фактора, повышающего функциональное состояние макрофагов мышей. *Иммунология* 1990; (5): 26–9.

ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY IN SURGICAL TREATMENT OF LUNG CANCER PATIENTS

*Yu.A. Grinevich, F.V. Filchakov,
V.L. Ganul, I.I. Smolanka*

Summary. *Clinical effectivity of adoptive immunotherapy (AIT) in the treatment of lung cancer (LC) employing the inductor immunotherapy and administration of generated in vitro autologic cytotoxic antitumor lymphocytes has been studied. In total 24 patients have been treated. The improvement of several immunological parameters has been registered in a short time upon such a treatment. AIT was well tolerable and resulted in decreasing the postoperative complication rate. Moreover, long-term follow-up upon AIT-based treatment regimen tends to show more favorable outcome, especially in the advanced LC with metastases to regional lymph nodes.*

Key Words: lung cancer, adoptive immunotherapy, $\alpha 2b$ -interferon, Tactivin, survival.