

Первый опыт использования лак-терапии с общей гипертермией в лечении химиорезистентных злокачественных опухолей у детей

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии¹,
Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии²
НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова³. г. Минск*

Приведены результаты лечения 5 детей с химиорезистентными распространенными злокачественными солидными опухолями с использованием общей гипертермии (ОГ) и ЛАК-терапии. У 3 больных имела место герминоклеточная опухоль, у 1 - недифференцированная саркома печени и у 1 - почечно-клеточный рак. Аутологичные ЛАК-клетки (0,5-1?10⁹) реинфузировались больным дважды: к концу сеанса общей гипертермии (когда температура тела снижалась с +42?С до +40,5?С) и на следующий день. Все дети удовлетворительно переносили процедуру ОГ. Серьезных осложнений мы не наблюдали. Последующее наблюдение за больными показало, что проведение такого лечения (термохимиобиотерапии) привело к полной или частичной регрессии опухолевых очагов у 2 детей. У остальных детей получена стабилизация процесса.

Ключевые слова: химиорезистентные опухоли у детей, ЛАК-терапия, общая гипертермия, химиотерапия.

Ismail-zade RS, Potapnev MP, Vashkevich EV, Zhavrid EA, Aleinikova OV, Savitskiy VP, Belevtsev MV. Isaykina YI

First experience of application the lak-therapy and whole body hyperthermia in the managment of refractory malignant tumours in children

Autologous LAK –therapy along with whole body hyperthermia (WBH, + 42-430C), hyperglycaemia (21-26 mmol/l) with chemotherapy was applied for treatment of 5 pediatric patients with refractory advanced malignant tumours. LAK-cells (0,5-1?10⁹) were infused twice; at the end of WBH procedure, when temperature decreased to 40-40,50C and the day after WBH. LAK –therapy as well as WBH did not lead to any serious organ dysfunction. Partial clinical response to thermochemobiotherapy was observed in 2 children. Minimal response or stable disease was achieved in 3 cases.

Key words: refractory malignant tumours in children, LAK-therapy, whole body hyperthermia, chemotherapy,

В клинической онкологии химиорезистентность является основной причиной терапевтических неудач, в связи с чем продолжается интенсивный поиск новых терапевтических подходов для ее преодоления и повышения эффективности лечения больных с далекозашедшими и рецидивными формами злокачественных опухолей. Попытки использовать мегатерапию с пересадкой костного мозга или стволовых клеток периферической крови существенно не улучшили результаты лечения [12, 21]. Большие надежды возлагаются в этом плане на применение биотерапия, в том числе гипертермии [2,3,4,8,11,15,16,19]. Влияние гипертермии на трансмембранный перенос и метаболизм может привести к преодолению лекарственной устойчивости и повышению иммуногенности опухоли [6]. Не являясь канцерогенным и мутагенным

агентом, гипертермия может вызвать в опухоли как апоптоз, так и некроз [22]. Накопленный практический опыт показал, что терапевтический эффект гипертермии зависит от температурного режима. Общая гипертермия ($>42^{\circ}\text{C}$) является оптимальной для повреждения опухолевых очагов и усиления их иммуногенности. На основании современных знаний о механизмах нарушения противоопухолевой защиты и подавления иммунного ответа у онкологических больных весьма обнадеживающим представляется включение в схемы лечения больных детей с далекозашедшими солидными опухолями различных цитокинов (Интерлейкин-2, Интерферона-альфа) и биоагентов [14,15]. Для большинства опухолей не обнаружено специфических опухолевых антигенов, а многие из них не экспрессируют молекулы МНС и, поэтому, не могут быть распознаны цитотоксическими лимфоцитами. Эффективными противоопухолевыми клетками являются естественные киллерные (ЕК) клетки, активность которых значительно усиливается под воздействием цитокинов. За последние годы среди эффекторов естественного противоопухолевого иммунитета наибольший практический интерес привлекли лимфокин-активированные киллерные (ЛАК) клетки, получаемые *in vitro* при инкубации лимфоидных клеток крови [9,10,13]. В нашей работе мы оценили возможность сочетать для повышения клинической эффективности использования жестких режимов общей гипертермии ($>42^{\circ}\text{C}$) и ЛАК-терапии у групп больных с резистентными и далекозашедшими онкологическими заболеваниями у детей.

Материал и методы исследования.

Пациенты. Многокомпонентное лечение с использованием ОГ проведено у 5 детей (мальчиков - 4, девочек - 1) с различными злокачественными опухолями и метастатическим поражением легких. Возраст детей составил от 8 до 17 лет. Все дети находились на лечении в РНПЦДОГ, Минск, Беларусь. Клиническая характеристика больных приведена в табл 1.

Таблица 1

Краткая клиническая характеристика детей с химиорезистентными опухолями подвергнутых к системной термохимиобиотерапии

№	Пол	Возраст	Гистологический тип	Стадия	Распространенность	Предшествующая терапия	Объем переливаемой ЛАК-клеток
1	Ж	12	ПКР, светлоклеточный тип	IV	Поражение левой почки + парааортальные узлы и средостение	8 блоков химиотерапии в условиях ОГ+ Интрон-А	$1,0 \times 10^9$
2	Ж	14	ЗГКО, смешанный тип	IV	Поражение правого легкого (II рецидив)	12 блоков химиотерапии. Удаление опухоли (дважды)	$0,8 \times 10^9$
3	М	11	ЗГКО, смешанный тип	IV	Поражение левого легкого + множественные мтс в парааортальных узлах и легких	3 блока химиотерапии	$0,5 \times 10^9$
4	М	12	ЗГКО, смешанный тип	IV	Поражение правого легкого + множественные мтс в парааортальных узлах и легких	3 блока химиотерапии	$0,5 \times 10^9$
5	М	8	Мезенхимальная саркома	III	Субтотальное поражение правой доли печени (I рецидив)	18 блоков химиотерапии и атипичная резекция правой доли	$0,5 \times 10^9$

У 3 детей была злокачественная герминоклеточная опухоль (ЗГКО), IV стадия. У одного больного с ЗГКО средостения и правого гемиторакса имел место второй

рецидив болезни с поражением левого легкого. Больному на предыдущих этапах лечения было проведено 12 блоков полихимиотерапии и блок высокодозной химиотерапии с пересадкой периферических стволовых клеток, а также две торакотомии с удалением опухоли. У двоих больных с ЗГКО было поражение яичка с множественными метастазами в парааортальных лимфатических узлах и обоих легких.

У одной больной был почечно-клеточный рак (ПКР) слева с метастазами в парааортальных лимфатических узлах и в средостении. После нефрэктомии и лимфаденэктомии было проведено 5 сеансов ОГ с введением доксорубина и Интрона-А (по 3 млн ед/м², ежедневно 3 дня до ОГ, перед сеансом ОГ и 3 дня после ОГ). Однако через 5 месяцев выявлено прогрессирование опухолевого процесса. Проведены еще 3 сеанса общей гипертермии (42°C – 3 часа) с введением 500 мг карбоплатина и Интрона-А с интервалом в 3 недели. Несмотря на это, была зафиксирована отрицательная динамика.

У одного больного была рецидивная злокачественная мезенхимальная саркома правой доли печени. Ему также противорецидивная химиотерапия проводилась в условиях ОГ и ЛАК-терапии.

Всего проведено 5 сеансов ОГ с биотерапией.

Получение ЛАК клеток. Накануне сеанса ОГ (за 48 -72 часа) больному проводили цитоферез на аппарате “Вахтер” (США) с забором мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) в количестве 1-2х10⁹ в конечном объеме 200 мл стабилизированной плазмы. Полученные МПК (?80% лимфоцитов) центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. при комнатной температуре для осаждения примеси эритроцитов. МПК, скопившиеся в виде белого кольца в слое плазмы, отбирали методом плазмозэкстракции, проводили подсчет клеток и цитологический контроль. Затем клетки в концентрации 2-3 млн/мл помещали в культуральную среду RPMI-1640 с добавлением глутамина, гентамицина (все реагенты фирмы Sigma, США) и интерлейкина-2 (ИЛ-2, препарата «Ронколейкин», Биотех, Россия; 1000 МЕ/мл) и инкубировали в одноразовых пластиковых флаконах (Sarstedt, Германия) в течение 2-3 суток в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 37°C, 95% влажности. Полученные аутологичные ЛАК-клетки дважды отмывали в физиологическом растворе, ресуспендировали в 250-500 мл физиологического раствора и передавали в клинику для внутривенного введения. До и после инкубации МПК проводили их цитологический контроль, а также *in vitro* анализ цитотоксической активности ЛАК-клеток против эритромиелобластной клеточной линии К-562, полученной из института цитологии РАМН (Санкт-Петербург, Россия). С этой целью клетки линии К-562 отмывали в среде RPMI-1640, доводили до концентрации 10⁶ клеток в 1 мл, окрашивали красителем карбоксифлуор-эсцеиндиацетат-сукцинилмидил эфир (КФСЭ) в концентрации 1,25 нг/мл и инкубировали при 37°C, 5% CO₂, 95% влажности 10 мин. Затем клетки отмывали полной питательной средой, ресуспендировали и смешивали с клетками-эффекторами, в качестве которых использовали МПК больных после культивирования с ИЛ-2 или без него (контроль). Соотношения эффектор-мишень составили 10:1, 20:1 и 40:1. Цитотоксический тест проводили в течение 4 часов. По окончании реакции в клеточную взвесь добавляли пропидиум иодид (PI) в концентрации 2,5 мкг/мл. Результаты реакции измеряли на проточном цитометре FACScan в программе CellQuest. Среди всех вовлеченных в реакцию клеток К-562 идентифицировали как включившие в себя КФСЭ, а «убитые»

среди них – как включившие в себя и КФСЭ (зеленое свечение), и РІ (красное свечение) [1].

Бактериологический контроль проводили на 4 этапах: 1 – при получении взвеси клеток из кабинета цитофереза, 2 – непосредственно перед инкубацией, 3 и 4 – перед введением (передачей в клинику) через 2 или 3 суток соответственно.

Общая гипертермия. Все сеансы ОГ осуществлялись на установках "Эмона" (г.Фрязино, Россия) и "Птичь" (Республика Беларусь) с генератором, работающим с частотой 13,56 МГц. Для проведения одновременно общей и регионарной гипертермии установка "Яхта-5" оснащена вторым генератором, работающим с частотой 40,68 МГц [17].

Сеансы ОГ проводились под общим комбинированным эндотрахеальным закисно-кислородным наркозом в сочетании с нейролептаналгезией. Время выхода в режим 41°C составляло в среднем 40-50 минут. Температура тела контролировалась датчиками, установленными в прямой кишке, пищеводе и в наружном слуховом проходе. При достижении этой температуры начиналось охлаждение головы обдувом холодного воздуха (0-4 °C) с помощью аппарата "Холод – 2". Необходимый температурный режим 42-42,5°C поддерживался 160-180 минут. Базовый температурный режим определялся индивидуально в зависимости от переносимости процедуры. Для создания режима гипергликемии (20-25 ммоль/л) во время сеанса ОГ больным вводили 40% раствор глюкозы в дозе 3,25 мл/кг в течение первых 30 минут, затем 2,5 мл/кг/ч. Предупреждение чрезмерной тахикардии и аритмии, а также профилактика ишемии миокарда обеспечивались введением в вену лидокаина в дозе 0,1-1,0 мг/кг/ч и обзидана 0,25-0,5 мг/ч. В случаях, когда уровень гипертермии превышал 42°C, применяли ангиопротекторы (дицинон, адроксон). Уротропин (40% раствор) вводили дважды: при достижении пика ректальной температуры (42,5-43°C) в дозе 0,2 мл/кг и в половинной дозе при выходе из гипертермического режима [7,18,20].

Во время сеансов ОГ проводили химиотерапию в зависимости от типа злокачественной опухоли и ранее проведенного лечения. При этом использовали: доксорубин (40-50 мг/м²), карбоплатин (400 мг/м²), этопозид (100-150 мг/м²), ифосфамид (3гр/м²). Все химиопрепараты, за исключением ифосфамида, вводили во время сеанса ОГ по достижению температуры 40-41°C. Ифосфамид вводили за 1 час до начала сеанса ОГ ввиду особенностей фармакокинетики их активного метаболита.

Совместное применение ОГ и ЛАК клеток. Аутологичные ЛАК клетки в дозе 0,3 – 0,5 × 10⁹ вводили внутривенно медленно в конце процедуры ОГ при снижении температуры тела до +40,5-41°C в 500 мл физиологического раствора со скоростью 100 мл/м²/час вместе с интерлейкином-2 в дозе 0,125 млн ЕД/м². На следующий день после сеанса ОГ введение ЛАК клеток повторяли.

Оценку клинического эффекта совместного применения ОГ и ЛАК клеток проводили по критериям ВОЗ на основании как клинического, так и визуализирующих методов исследования

Результаты и их обсуждение

Результаты анализа цитотоксической активности *in vitro* против эритромиелобластной клеточной линии К-562 убедительно продемонстрировали достоверное увеличение цитотоксичности ЛАК-клеток в процессе их получения в течение 2-3 суток (Рис.1).

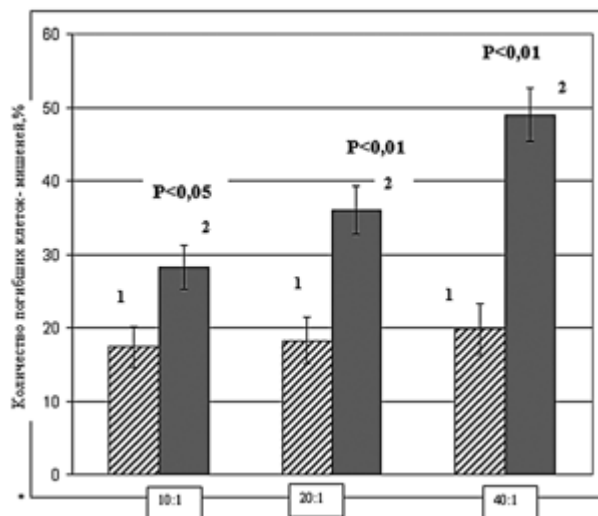


Рис.1. Влияние культивирования с ИЛ-2 (1000 ЕД/мл) в течение 2 суток на цитотоксическую активность МПК онкологических больных (n=5) против опухолевых клеток линии К 562 при различных соотношениях клеток –эффекторов и мишеней.

1 – МПК культивировали без ИЛ-2,

2 – МПК культивировали в присутствии ИЛ-2 (ЛАК-клетки)

Все дети удовлетворительно переносили процедуру ОГ. На следующий день после сеанса они практически не нуждались в постельном режиме. Всем больным проводилось только инфузионное лечение на 1-2 дня с целью поддержания водно-солевого баланса. Тяжелых осложнений, описанных в литературе, таких как большие и глубокие ожоги, ДВС-синдром, повреждение спинного мозга (со всеми последствиями), нарушение функции сердца и почек, мы не наблюдали [5]. У одного больного после сеанса ОГ был поверхностный ожог кожи задней поверхности бедра площадью 9 см², который требовал лишь местного лечения.

Непосредственные результаты системной термохимиобиотерапии оценены у всех детей, получавших неоадьювантное лечение на основании как клинического, так и визуализирующих методов исследования (УЗИ, КТ). Результаты представлены в табл. 1. Согласно полученным данным, объективный лечебный эффект (полная и частичная регрессия (CR+PR)) достигнут у 2 из 5 детей (Рис.2). У остальных больных получена стабилизация процесса (SD) или минимальная регрессия (MR).

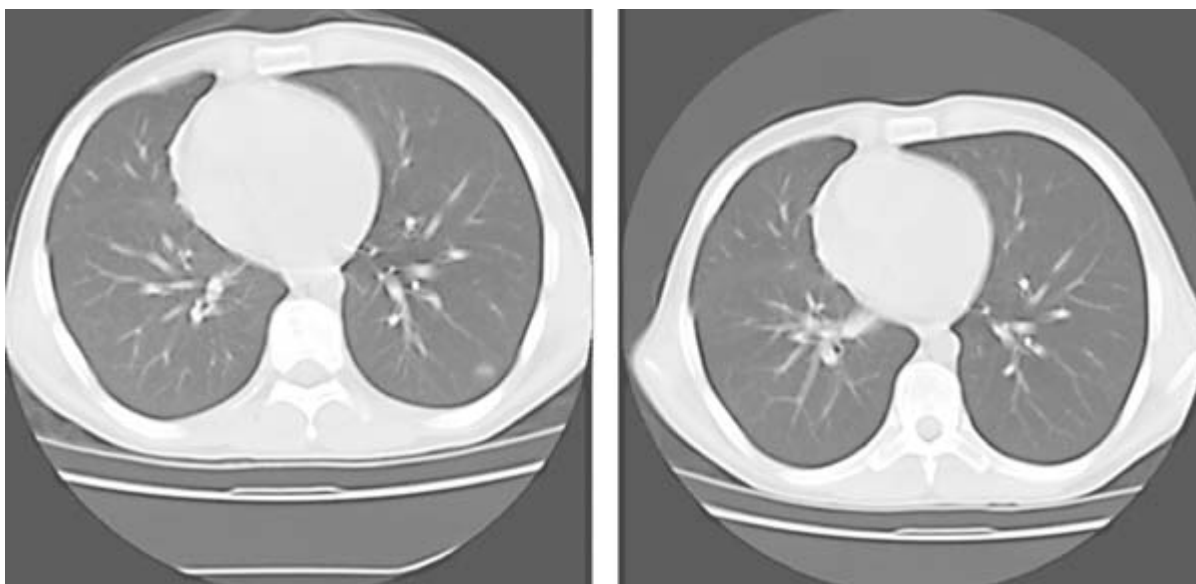


Рис.2. Метастатическое поражение правого легкого при ЗГКО (второй рецидив болезни)

а – до лечения ;

б- спустя 10 дней после термохимиобиотерапии, полное исчезновение метастатической опухоли

В настоящее время все больные живы. Сроки наблюдения за больными невелики (3-8 месяцев), однако полученные данные весьма обнадеживают с учетом прогностической характеристики леченых больных.

Таким образом, одним из новых перспективных путей повышения эффективности лечения больных с далекозашедшими, химиорезистентными формами злокачественных опухолей может быть ОГ в жестком температурном режиме в комбинации с ЛАК-терапией. Необходимо дальнейшее исследование для оптимизации лечебной стратегии с включением ОГ и биотерапии у этой категории больных.

Выводы

1. Цитоферез на современных аппаратах (“Baxter” и др.) позволяет получить за одну процедуру лимфоцитарную массу из периферической крови в количестве $1-2 \times 10^9$ мононуклеартных клеток, что достаточно для проведения нескольких сеансов ЛАК терапии.

2. Современный медико-технический уровень специализированного лечебного учреждения, а также адекватное анестезиолого-реанимационное обеспечение позволяют провести ОГ в жестком режиме без серьезных осложнений.

3 Использование ЛАК-терапии в сочетании с системной термохимиотерапией позволяет достичь объективный положительный клинический эффект у части больных с химиорезистентными распространенными опухолями.

1. Бахус Г.О., Мазуров Д.В., Кулаков В.В. и др. Разработка метода функциональной активности естественных киллерных клеток с использованием проточной цитометрии. // Иммунология. – 2001. – №3. – С. 59-61.

2. Жаврид Э.А., Осинский С.П., Фрадкин С.З. Гипертермия и гипергликемия в онкологии. Киев : Наук.Думка, 1997. 256 с.

3. Исмаил-заде Р.С., Жаврид Э.А., Потапнев М.П. Использование общей гипертермии в лечении рефракторных, распространенных солидных опухолей у детей. Онкология на рубеже XXI века. Возможности и перспективы: Материалы Международ науч форума. Москва. 1999: 143-144.

4. Исмаил-заде Р.С., Буглова С.Е., Потапнев М.П. и др. Термохимиотерапия при рефрактерных и далеко зашедших злокачественных опухолях у детей. *Вопр онкол* 2002; 48(3): 351-355.
5. Карев И.Д., Родина А.А., Карева А.И. Общая гипертермия (42,0-43,4°C) в лечении больных с саркомами мягких тканей. *Рос онкол журн* 2003; N 6; 29-32.
6. Курпешов О.К., Цыб АФ., Мардынский Ю.С., Бердов Б.А. Механизмы развития и пути преодоления химиорезистентности опухолей. *Рос. онкол. журнал* 2003; N 3: 50-53
7. Сувернев А.В. Пат. РФ N 2126667, выдан 05.05.1998 г
8. Fritz K.L., Koziol S., Fabian D.F., Lefor A.T., Tumor necrosis factor alpha mediates the antitumor effect of combined interleukin-2 and whole body hyperthermia. *J Surg Res.* 1996; 60(1): 55-60.
9. Grimm E.A., Mazumder A, Zhang H.Z. et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982;27;1823-41
10. Hoffman D.M., Gitlitz B.J., Belldegrun A, Figlin R.A. Adoptive cellular therapy. *Semin Oncol* 2000; 27;221-33
11. Ismail-zade R., Zhavrid E., Sachivko N., Potapnev M. Whole body hyperthermia in multimodal treatment of advanced pediatric solid tumors. *Abstracts of XXIV International Congress on Clinical Hyperthermia 2001: Rome : Abstract book II: 46.*
12. Koscielniak E., Klingebiel T, Peters C, et al. Do patients with metastatic and recurrent rhabdomyosarcoma benefit from high dose therapy with hematopoietic rescue. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19: 221-231
13. Kimura H., Yamaguchi Y. Adjuvant chemo-immunotherapy after curative resection of stage II and III primary lung cancer. *Lung Cancer* 1996;14; 301-14
14. Kiss C, Kiss M, Szegedi I, et al. Interferon-alpha therapy in children with malignant disease: clinical experience in twenty-four patients treated in a single pediatric oncology unit. *Med. Pediatric Oncol.* 2002; 39: 115-119
15. Oldham R.K. *Principles of Cancer Biotherapy* Kluwer Academic Publishers. — 2003. — P. 230 с.
16. Lindner H., Tilling B. Treatment of recurrent neuroblastoma in childhood with whole body thermochemotherapy. *Pediatric Grenzgeb* 1993; 31(1): 187-194
17. Mazokhin VN, Kolmakov DN, Lucheyov NA, et al. A HF EM installation allowing simultaneous whole body and deep local EM hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2000: May-Jun;16(3): 287-290.
18. Souvernev A.V, Vereschagin E.I, Kinzt D.N. et al. Clinical effects of Whole body severe hyperthermia (43,5-44°C). *Abstracts of XXIV International Congress on Clinical Hyperthermia 2001: Abstract book I: 31.*
19. Schippel P., Lotz I., Rothe K et al. Whole body thermochemotherapy in an infant with rhabdomyosarcoma and pulmonary metastases. *Med. Pediatr Oncol* 2003; 41(5): 78-480.
20. Vereschagin E.I, Souvernev A.V, Pisarev A.S., et al. Whole body severe hyperthermia (43,5-44°C) as a method of intensive care of infectious diseases. *Abstracts of XXIV International Congress on Clinical Hyperthermia. 2001 : Abstract book I : 28.*
21. Walterhouse D.O, Hoover M.L, Marymont M.H, et al. High dose chemotherapy followed by peripheral blood stem cell rescue for metastatic rhabdomyosarcoma. *Med Pediatr Oncol* 1999; 32(2): 88-92.

22. Yonezawa M, Otsuka T, Matsui N, et al. Hyperthermia induced apoptosis in malignant fibrous histiocyoma cell in vitro. International Journal