

Работа выполнена в Московском Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А.Герцена.(Директор – академик РАМН, профессор В.И.Чиссов).

Научный руководитель

доктор медицинских наук, профессор И.Г.Русаков

Научный консультант

доктор биологических наук, профессор Р.И.Якубовская

Официальные оппоненты :

доктор медицинских наук, профессор Б.П.Матвеев

доктор медицинских наук, профессор О.Б.Лоран.

Ведущее учреждение: Московский научно-исследовательский институт диагностики и хирургии.

Защита состоится « ___ » _____ 1998г.

В « ___ » часов на заседании диссертационного Совета Д.084.17.01 при Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А.Герцена (125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, дом 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан « ___ » _____ 1998г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук, профессор И.А.Максимов

Актуальность темы.

Рак мочевого пузыря (РМП) представляет актуальную проблему онкологии, составляя 70% новообразований органов мочевого тракта и около 4% в структуре всей онкологической патологии. Заболеваемость РМП ежегодно возрастает, особенно в индустриально развитых странах, как в абсолютном числовом выражении, так и по отношению к частоте рака большинства других локализаций. В России в 1996 г. на долю опухолей мочевого пузыря приходилось 2,5% всех злокачественных новообразований, прирост показателя заболеваемости с 1989 г. составил 25,2% (Чисов В. И. и соавт., 1997).

Особую проблему представляет лечение поверхностных опухолей мочевого пузыря, то есть опухолей с инвазией не глубже слизистого слоя (T_a, T_{is}, T₁ N₀ M₀), которые наблюдаются в 70-85% случаев. В последние годы основным методом лечения поверхностного РМП стала трансуретральная резекция мочевого пузыря (ТУР), практически вытеснившая другие органосохраняющие методы оперативного лечения. Однако частота возникновения рецидивов после ТУР крайне высока (50-90%, в среднем 80%) (Holmang S. и соавт., 1995). Возникновение рецидивов связано с диффузным характером неопластических изменений в слизистой мочевого пузыря, множественностью опухолевых зачатков, наличием невыявляемых очагов *carcinoma in situ*, сопутствующих папиллярным опухолям, возможностью имплантации опухолевых клеток во время операции.

Кроме того радикальная ТУР иногда невыполнима при мультицентрическом росте опухолей, при наличии участков рака *in situ*. Все эти факторы заставляют искать дополнительные методы лечения и пути профилактики рецидивов РМП путем применения различных вариантов внутривезикулярной терапии.

К таким методам относятся внутривезикулярная химиотерапия и иммунотерапия. Однако внутривезикулярное введение цитостатиков при относительно невысокой их эффективности приводит к достаточно выраженным местным и системным токсическим проявлениям. Более эффективным способом лечения и профилактики рецидивов поверхностного РМП является внутривезикулярная иммунотерапия вакциной БЦЖ (Матвеев

Б. П. и соавт., 1991, Фигурин К. М., 1994, Негг Н. W. и соавт., 1995, Lamm D. L., 1997). Но применение данной методики также ограничивается токсичностью БЦЖ и возможностью развития тяжелых специфических осложнений (гранулемы, туберкулез, сепсис) (Lamm D. L. и соавт., 1986). В то же время различные экспериментальные и клинические исследования показали, что механизм действия БЦЖ при внутривезикулярном введении тесно связан с индукцией целого ряда цитокинов и что именно цитокины через активацию опухольинфильтрирующих Т-лимфоцитов обеспечивают противоопухолевый эффект БЦЖ-терапии (Kurisu H. и соавт., 1994, O'Donnell M. A. и соавт., 1995). Наиболее широким спектром иммунотерапевтического и противоопухолевого действия обладают интерлейкин-2 (ИЛ-2) и интерферон альфа-2 (ИФН альфа-2). Эти цитокиновые препараты уже начали применяться для лечения и профилактики рецидивов РМП, но число работ, посвященных внутривезикулярной цитокиновой иммунотерапии невелико, не существует единой методики лечения, режимы введения и дозы препаратов существенно различаются, в связи с чем нельзя однозначно оценить эффективность терапии. В отечественной литературе отсутствуют работы, посвященные внутривезикулярной терапии цитокинами. Таким образом, разработка новых эффективных и безопасных методик внутривезикулярной иммунотерапии с использованием цитокиновых препаратов является актуальной задачей онкоурологии.

В литературе также широко обсуждается роль и значение в процессах канцерогенеза и опухолевой прогрессии ингибиторов протеолитических ферментов, а также возможность их применения в противоопухолевой терапии (Tashiro K. и соавт., 1989, Nishino N., 1990 Kobayashi H и соавт., 1995). Известно также, что продукция ингибиторов протеиназ тесно связана с уровнем продукции цитокинов (Endo S. и соавт., 1990, Ueo H, 1992). В связи с этим актуальным является изучение динамики концентрации ингибиторов протеиназ во время проведения внутривезикулярной цитокиновой терапии, что может иметь существенное прогностическое значение и создавать предпосылки для использования новых препаратов в качестве агентов для внутривезикулярного введения.

Цель и задачи исследования.

Цель исследования - повышение эффективности лечения поверхностного РМП путем разработки новых методов внутрипузырной иммунотерапии с применением рекомбинантных цитокиновых препаратов: интерлейкина-2 (Ронколейкин) и интерферона альфа-2b (Реальдирон и Интрон А).

Для достижения данной цели поставлены следующие Задачи:

1. Разработать методику внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином и оценить эффективность данного препарата при его внутрипузырном применении для лечения поверхностного РМП.

2. Разработать методику внутрипузырной иммунотерапии Реальдироном и Интроном А и оценить эффективность этих препаратов при их внутрипузырном применении для профилактики рецидивов поверхностного РМП.

3. Изучить особенности иммунного статуса у больных поверхностным РМП в процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии.

4. Исследовать изменения концентрации ингибитора трипсина мочи (уриностатина) у больных РМП в процессе проведения внутрипузырной терапии

Научная новизна.

Впервые в нашей стране разработан и апробирован в клинике новый метод лечения поверхностного РМП - внутрипузырная иммунотерапия с применением препарата рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкин). При этом показана высокая эффективность данного метода и отсутствие токсичности Ронколейкина при внутрипузырном применении. Впервые применена оригинальная методика внутрипузырного введения, основанная на принципе суточного дробления дозы и увеличения экспозиции препарата в полости мочевого пузыря.

Изучена динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных РМП в процессе внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином, выявлена системная активация иммунитета, наступающая после проведения каждого курса лечения.

Впервые проведено исследование концентрации ингибитора трипсина мочи (уриностаина) у больных РМП с различной степенью инвазии опухоли и у больных в процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином, при этом показано, что в группе больных с высоким уровнем противоопухолевого ответа наблюдается увеличение содержания уриностаина в моче, что является прогностически благоприятным признаком.

Впервые в нашей стране разработан и применен метод профилактики рецидивов поверхностного РМП после хирургического лечения, основанный на применении препаратов рекомбинантного ИФН альфа-2b (Реальдирон и Интрон А) по оригинальной методике.

Практическая значимость.

При анализе полученных результатов установлено, что отечественный препарат Ронколейкин при внутрипузырном применении обладает высокой эффективностью (85,72%) и низкой токсичностью. Внутрипузырная иммунотерапия с использованием Ронколейкина может быть применена как метод выбора для лечения больных поверхностным РМП с мультицентрическим ростом опухолей и с единичными опухолями, когда хирургическое лечение противопоказано.

Показано, что исследование уровня ингибитора трипсина мочи (уриностаина) во время проведения внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином имеет прогностическое значение, так как повышение концентрации уриностаина во время лечения позволяет прогнозировать высокий уровень противоопухолевого эффекта.

Установлено, что при проведении профилактической внутрипузырной иммунотерапии поверхностного РМП препаратами рекомбинантного ИФН альфа-2b (Реальдирон и Интрон А) достоверно снижается частота возникновения рецидивов опухолей

(14,3%) и прогрессирования процесса (8,6%) по сравнению с только хирургическим лечением (соответственно 55% и 30%).

Таким образом, проведенное исследование позволяет улучшить результаты лечения и профилактики рецидивов поверхностного РМП, что способствует внедрению методов внутрипузырной цитокиновой иммунотерапии в практику.

Внедрение в практику.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения внутрипузырной иммунотерапии цитокиновыми препаратами для лечения и профилактики рецидивов поверхностного РМП. Разработанные методы внутрипузырной иммунотерапии и иммунопрофилактики используются в клинике онкоурологии МНИОИ им. П. А. Герцена, а также в отделениях онкоурологии ГКБ №57, ГКБ №62, онкоуроцентре Московского городского онкологического диспансера и онкоурологических кабинетах Центрального и Северо-Восточного округов г. Москвы.

Апробация работы.

Основные материалы диссертации были доложены на XXXI Конференции молодых ученых МНИОИ им. П. А. Герцена (22 декабря 1995 г., Москва), на V Международном конгрессе «Человек и лекарство» (16 апреля 1997 г., Москва), на VII Международном Конгрессе по противоопухолевой терапии (февраль 1997 г., Париж), на I Международном Конгрессе UICC по достижениям в лечении рака (30 июня 1997 г., Вена), на 2 Всероссийской научной конференции по онкоурологии с участием стран СНГ (20 ноября 1997 г., Обнинск).

Апробация диссертации состоялась 24.09.98 на межотделенческой клинической конференции МНИОИ им. П. П. Герцена с участием сотрудников отделений онкоурологии, абдоминальной онкологии, химиотерапии, малой инвазивной хирургии и диагностики, лабораторий модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии и прогноза противоопухолевой терапии.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на _____ страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и указателя литературы, содержит _____ таблиц и _____ рисунков. Список литературы включает _____ источников, из них _____ иностранные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Общая характеристика наблюдений и методов обследования.

В настоящее исследование по изучению эффективности внутрипузырной иммунотерапии с применением ИЛ-2 и ИФН альфа-2b и по изучению содержания в моче больных РМП ингибитора трипсина включено 82 больных РМП. Из них мужчин - 62 человека, женщин - 20 человек (соотношение мужчины/женщины - 3,1:1). У всех больных верифицирован переходноклеточный РМП различной степени дифференцировки. Стадия заболевания устанавливалась согласно Международной TNM классификации злокачественных опухолей (4 редакция). У 11 больных диагностирована 0 стадия РМП (TaNXMo), у 61 - I стадия (T1NXMo), у 2 - II стадия (T2N0Mo), у 2 - III стадия (T3N0Mo), у 4 больных - IV стадия (T4N0Mo).

Стадию процесса, уровень противоопухолевого эффекта лечения, появление или отсутствие рецидивов при проведении профилактической терапии определяли с помощью цистоскопии с множественной биопсией и ультразвукового исследования (УЗИ) с применением трансабдоминального, трансректального (у женщин - трансвагинального) и трансуретрального методов.

Иммунологическое исследование проводили с помощью методики иммунофенотипирования мононуклеаров периферической крови. Определение процентного содержания субпопуляций мононуклеаров периферической крови проводили с использованием метода непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител (МКАТ) к поверхностным дифференцировочным антигенам мононуклеаров и проточного цитофлюориметра.

Содержание ингибитора трипсина мочи (уриностатина) определяли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител. Для исследования использовали утреннюю порцию мочи.

В зависимости от применяемого метода лечения или исследования все больные были разделены на 4 группы:

I группа - 14 больных, которым проводилась внутрипузырная иммунотерапия Ронколейкином (рекомбинантный дрожжевой ИЛ-2 человека).

II группа - 27 больных, которым проводилось определение концентрации ингибитора трипсина мочи (уриностатина), в том числе 11 пациентов из I группы.

III группа - 15 больных, которым проводилась профилактическая внутрипузырная иммунотерапия Реальдироном (рекомбинантный ИФН альфа-2b человека).

IV группа - 20 больных, которым проводилась профилактическая внутрипузырная иммунотерапия Интроном А (рекомбинантный ИФН альфа-2b человека).

V группа - 20 больных, которым проведено только радикальное хирургическое лечение (контрольная группа).

Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного РМП с применением препарата рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкин).

Характеристика больных.

В исследовании по изучению эффективности внутрипузырной иммунотерапии поверхностного РМП рекомбинантным ИЛ-2 включено 14 больных. Из них мужчин - 11, женщин - 3 (соотношение мужчины/женщины - 3,7:1). Возраст больных составил от 43 до 76 лет, средний возраст - 56,36 лет. По стадии заболевания больные распределились следующим образом: 0 стадия (TaTXM0) - 3 человека, I стадия (T1NXM0) - 11 человек. У 2 больных наблюдались единичные, у 12 - множественные опухоли. У 6 пациентов опухоли были первичные, у 8 - рецидивные. Размеры опухолевых очагов варьировали от 0,3 до 3,5 см. У 9 больных наблюдался высокодифференцированный

(G1), у 4 - умереннодифференцированный (G2) и у 1 больного - низкодифференцированный переходноклеточный РМП.

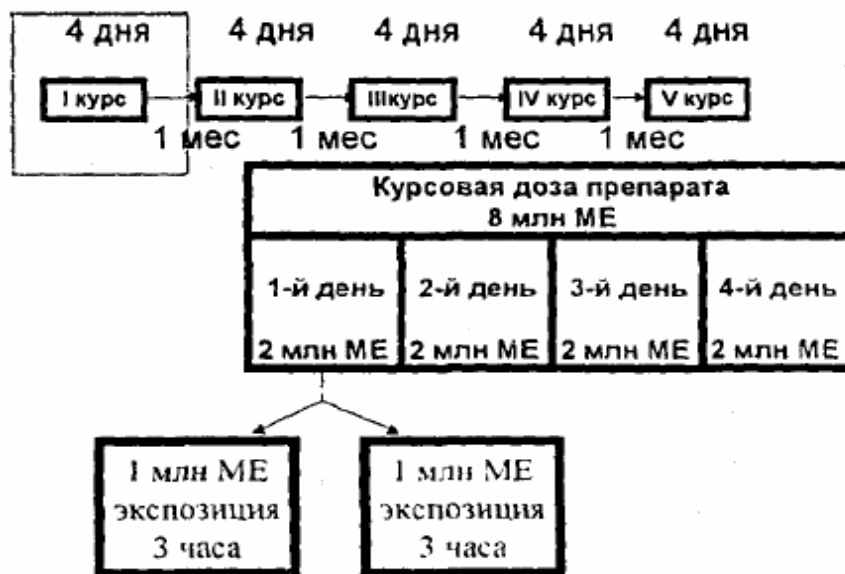
До начала и по окончании каждого курса иммунотерапии всем больным производилось клиническое обследование, цистоскопия, УЗИ мочевого пузыря, а также иммунологическое исследование крови и определение концентрации уриностаина в моче.

Методика лечения.

Методика проведения внутрипузырной иммунотерапии ИЛ-2 состояла в следующем

Рис. 1

Методика внутрипузырной иммунотерапии препаратом Ронколейкин (интерлейкин-2)



Каждому больному проводилось 5 повторных идентичных курсов лечения с интервалом в 1 месяц. Каждый курс продолжался в течение 4 дней. Ежедневно больным после опорожнения мочевого пузыря по катетеру в полость пузыря вводили 1 млн МЕ ИЛ-2, разведенного в 50,0 мл стерильного физиологического раствора. Больным предлагалось удерживать положение тела (через каждые 20-30 мин) для равномерного омывания всех стенок мочевого пузыря, после чего пациенты

самостоятельно опорожняли мочевой пузырь посредством мочеиспускания, Затем по катетеру вновь вводили 1 млн МЕ ИЛ-2 в 50,0 мл физиологического раствора, и больные также удерживали препарат в течение 3 часов, Таким образом, суточная доза препарата составляет 2 млн МЕ, а общее суточное время удерживания - 6 часов. Такая схема дробления дозы выбрана нами в связи с тем, что, исходя из теоретических предпосылок и данных литературы, увеличение времени контакта препарата со слизистой мочевого должно усиливать терапевтический эффект. Продолжительность курса лимитировалась сроками развития толерантности к препарату, а интервалы между курсами выбраны в связи с представлениями о возможной продолжительности периода активации системы иммунитета (как местного, так и системного).

В качестве лекарственной формы ИЛ-2 применялся препарат «Ронколейкин» (рекомбинантный дрожжевой ИЛ-2 человека), производимый ТОО «Биотех» при Санкт-Петербургском Государственной Университете.

Результаты лечения.

В результате проведенного лечения получены следующие результаты: у 6 больных (42,86%) достигнута полная регрессия опухолей, у 6 больных (42,86%) - частичная регрессия, у 1 больного (7,14%) - стабилизация и у 1 больной (7,14%) - прогрессирование опухолевого процесса. Таким образом, уровень объективного противоопухолевого эффекта ИЛ-2 при внутрипузырном применении (сумма % полных и частичных регрессий) составил 85,72%. Индивидуальные уровни регрессии опухолей у больных, получавших внутрипузырную иммунотерапию Ронколейкином представлены в Таблице 1.

Из 6 больных, у которых достигнута полная регрессия опухолей, у 4 наблюдалось первично выявленное опухолевое поражение, у 2 больных - рецидив РМП после хирургического лечения (у 1 больной - после 3 ТУР в 1990, 1992 и 1994 гг, у 1 больной - после ТУР в 1993 г).

Таб 1.

Индивидуальные уровни регрессии опухолей у больных, получавших внутривузырную иммунотерапию Ронколейкином

Фамилии Больных	Предшествующее Лечение	Количество опухолей	Уровень регрессии
Б-ая З-на	ТУР	3	полная
Б-ая Ш-ва	неоднокр. ТУР	3	полная
Б-ной К-ер	Резекция МП, неоднокр. ТУР, в/пуз. ХТ, БЦЖ	>3	частичная
Б-ной Н-ва	Неоднокр. ТУР, резекция МП, ЛТ	>3	прогрессирование
Б-ой Б-ий	не было	3	полная
Б-ой Д-ев	не было	>3	полная
Б-ой Е-ин	резекция МП	2	частичная
Б-ой К-ов	не было	>3	полная
Б-ой Н-ин	не было	>3	частичная
Б-ой П-ин	неоднокр. ТУР	2	частичная
Б-ой П-ов	не было	1	стабилизация
Б-ой Р-ев	резекция МП, ЛТ, неоднокр. ТУР, 3 курса ФДТ	>3	частичная
Б-ой Х-ин	не было	>3	полная
Б-ой Ш-ов	резекция МП, ЛТ, ТУР	1	частичная

Ни одному из этих пациентов до начала иммунотерапии не проводилось никакой специфической противоопухолевой терапии (лучевая, химиотерапия, БЦЖ-терапия). У всех 6 больных опухоли были множественными, размеры опухолевых очагов не превышали 3,0 см. Гистологически у всех пациентов с полной регрессией определялся высокодифференцированный переходноклеточный рак (I степень клеточной анаплазии или G1).

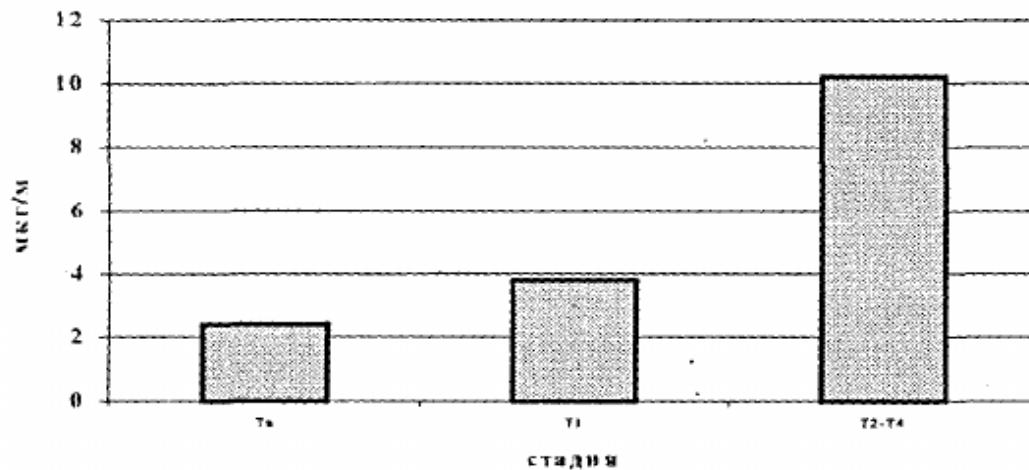
Регрессия опухолевого процесса более чем на 50 % отмечена у 6 больных, у 1 - с первичной и у 5 - с рецидивными опухолями. Мультицентрический рост наблюдался у 5 больных, единичная опухоль у 1 больного. Всем больным из этой подгруппы после окончания иммунотерапии проведено хирургическое удаление остаточных опухолей.

Распределение больных в зависимости от уровня противоопухолевого эффекта и степени дифференцировки опухоли представлено на Рисунке 2.

Достоверно судить о зависимости эффективности лечения от степени анаплазии опухоли не представляется возможным в связи с небольшим количеством наблю-

дений. Однако из представленных данных видно, что у больных с высокодифференцированным РМП (G1) внутрипузырная иммунотерапия ИЛ-2 чаще приводит к выраженному клиническому эффекту. Так, из 9 больных с РМП I степени анаплазии у 6 наблюдалась полная регрессия и у 3 частичная регрессия опухолей, тогда как из 4 больных с умереннодифференцированными новообразованиями у 3 достигнута частичная регрессия, а у 1 больной - прогрессирование опухолевого процесса. Таким образом, высокая степень дифференцировки опухоли (G1) является благоприятным фактором прогноза эффективности внутрипузырной иммунотерапии поверхностного РМП с использованием ИЛ-2.

Концентрация уриностаина в зависимости от степени инвазии опухоли



На Рисунке 3 показано распределение больных с различной степенью эффективности лечения в зависимости от наличия предшествующего иммунотерапии лечения. В группе 6 больных с первичными опухолями у 4 достигнута полная регрессия опухолей, у 1 - частичная регрессия и у 1 - стабилизация процесса.

У больных с рецидивными опухолями полная регрессия наблюдалась только в 2 случаях из 8, частичная - у 5 больных и прогрессирование - у 1 больной. Из 4 больных с рецидивами РМП после проведенного комбинированного противоопухолевого лечения (хирургическое лечение + лучевая терапия у 2 больных, хирургическое лечение + лучевая терапия + фотодинамическая терапия у 1 больного и хирургическое лечение + внутривезикулярная химиотерапия и БИЖК-терапия у 1 больного) у 3 наблюдалась частичная регрессия опухолей и у 1 - прогрессирование заболевания. В то же время в группе с полной регрессией только у 2 больных были рецидивные опухоли, у 1 - после 3 ТУР, у 1 - после 1 ТУР в анамнезе. Следовательно, внутривезикулярная иммунотерапия более эффективна у больных с первичными опухолями и у больных с рецидивами РМП, которым не проводилась специфическая противоопухолевая терапия (лучевая или лекарственная).

Токсичность препарата.

Как во время, так и после проведения курсов внутривезикулярной иммунотерапии Ронколейкином нами не отмечено никаких специфических побочных реакций и

осложнений. В то же время субъективно больные отмечали некоторое уменьшение дизурических явлений, наступающее обычно после 1-2 курсов. Ни у одного больного не наблюдалась гипертермия, ознобы, гипотензия, то есть те побочные эффекты, которые нередко развиваются при системном применении ИЛ-2. В клинических и биохимических анализах крови не отмечено каких-либо существенных сдвигов. В анализах мочи в процессе проведения иммунотерапии наблюдались изменения, характерные для картины хронического цистита. Следует отметить, что умеренная гематурия не является противопоказанием для введения препарата, как это имеет место при БЦЖ-терапии.

Полученные нами результаты несколько превосходят результаты внутрипузырной иммунотерапии с применением рекомбинантного ИЛ-2, описанные в литературных источниках, что можно объяснить особенностями методики лечения и высокой активностью препарата Ронколейкин. Так, в работах Piza и соавт. (1987) и Gomella и соавт. (1993), применявших традиционную методику внутрипузырного лечения, в группах по 14 больных в каждой полная регрессия составила соответственно 36% и 29%. Результаты лечения улучшаются при использовании пролонгированного, а не дискретного введения препарата. Den Otter (1998) добился полной регрессии у 8 из 10 больных, применяя 5-дневный курс непрерывного введения ИЛ-2, а Huland и соавт. удалось получить при непрерывной 24-часовой перфузии препарата полную регрессию даже у больного с инвазивной опухолью.

Разрабатывая методику внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином мы исходили из предположения, что увеличение продолжительности контакта ИЛ-2 со слизистой мочевого пузыря при хорошей переносимости препарата должно увеличивать эффективность лечения. Это можно объяснить тем, что в основе механизма действия ИЛ-2 лежит не прямое цитолитическое действие, а активация популяции опухолинфильтрирующих Т-лимфоцитов и NK-клеток. При местном применении препарат теряет активность медленнее, чем при системном, в связи с чем большое значение для стимуляции лимфоцитов имеет не только доза, но и степень адсорбции цитокина, которая возрастает при увеличении времени контакта ИЛ-2 с субстратом. Нами впервые использованы режим курсовой внутрипузырной терапии, включающий проведе-

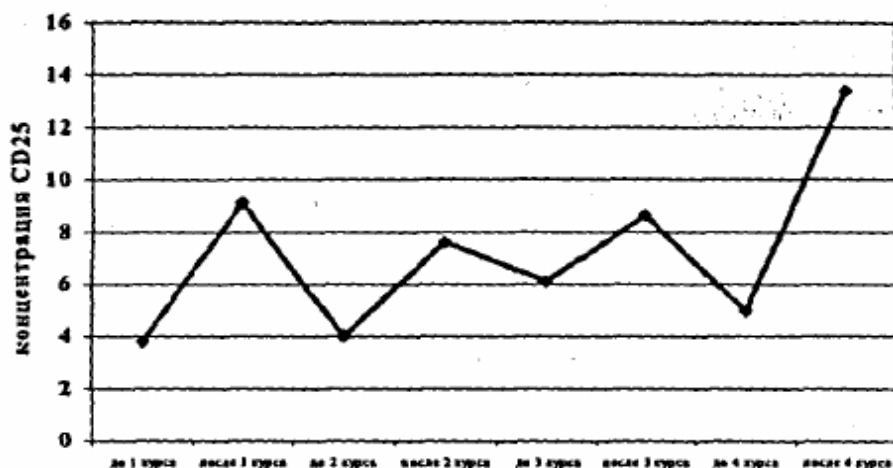
ние последовательных 4-дневных инстилляций, и методика суточного дробления дозы. При проведении исследования установлено, что Ронколейкин не обладает при внутрипузырном применении ни местной, ни системной токсичностью, поэтому при соблюдении правильной техники катетеризации и правил асептики возможность развития осложнений минимальна.

Иммунный статус у больных РМП в процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином.

Иммунологическое исследование, включающее определение показателей субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, проводилось у больных, получавших внутрипузырную иммунотерапию ИЛ-2, до начала и по окончании каждого курса лечения. При анализе иммунного больных до начала лечения отмечается, что несколько снижено общее количество Т-лимфоцитов периферической крови и на нижней границе нормы находится процент Т-хелперов/индукторов. При этом иммунорегуляторный индекс остается в пределах нормальных значений. Подобные изменения иммунного статуса характерны для больных поверхностным РМП и согласуются с данными литературы.

Анализ динамики субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных в процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии не выявил значимых изменений процентного содержания и уровня средней экспрессии всех исследованных субпопуляций, за исключением CD25-позитивных лимфоцитов. Динамика колебаний содержания CD25-позитивных лимфоцитов представлена в и на Рисунке 4

Динамика изменений процентного содержания субпопуляций CD25-позитивных лимфоцитов во время проведения внутрипузырной иммунотерапии ИЛ-2



Заслуживает внимания повышение процентного содержания субпопуляции CD25-позитивных лимфоцитов (то есть лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к ИЛ-2), впервые наступающее и особенно выраженное после завершения 1 курса иммунотерапии и сохраняющееся в той или иной степени на протяжении всего лечения. К началу каждого последующего курса процентное содержание субпопуляции CD25-позитивных лимфоцитов несколько снижается, оставаясь тем не менее выше фоновых (до начала лечения) показателей, по завершении же курса вновь отмечается повышение данного иммунологического показателя. Как известно, кластер дифференцировки CD25, представляющий собой клеточный рецептор к ИЛ-2, является одним из активационных лимфоцитарных маркеров, а субпопуляция CD25-позитивных лимфоцитов представляет собой субпопуляцию активированных лимфоцитов. Соответственно, повышение процентного содержания в периферической крови CD25-позитивных лимфоцитов расценивается в клинической иммунологии как свидетельство системной активации иммунной системы, что, следовательно и имеет место в процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии ИЛ-2 и, возможно, вносит определенный вклад в повышение напряженности противоопухолевого иммунитета на уровне макроорганизма. Такого рода системная активация иммунной

системы, учитывая местный характер проводимой иммунотерапии, несколько парадоксальна. Объяснение данному феномену лежит, по-видимому, в процессах миграции активированных CD25-позитивных лимфоцитов из слизистой мочевого пузыря в кровеносное русло или частичного всасывания ИЛ-2 в кровь, протекающих на фоне повреждения гистотканевого барьера в месте локализации опухоли.

Ингибитор трипсина мочи (уриностагин) у больных РМП.

Характеристика больных.

В исследование по изучению содержания в моче ингибитора трипсина (уриностагин) включено 27 больных РМП. Из них мужчин - 24 человека, женщин - 3 (мужчины/женщины - 8:1). Учитывая, что концентрация уриностагина существенно зависит от степени инвазии опухоли, по распространенности опухолевого процесса мы разделили больных на следующие подгруппы:

- неинвазивные опухоли (0 стадия; T₀NXMO) - 3 человека
- поверхностно-инвазивные опухоли (с инвазией не глубже подслизистого слоя) (I стадия, T₁NXMO) - 16 человек
- инвазивные опухоли (II, III, IV стадия; T₂NXMO, T₃NXMO, T₄NXMO) - 8 человек

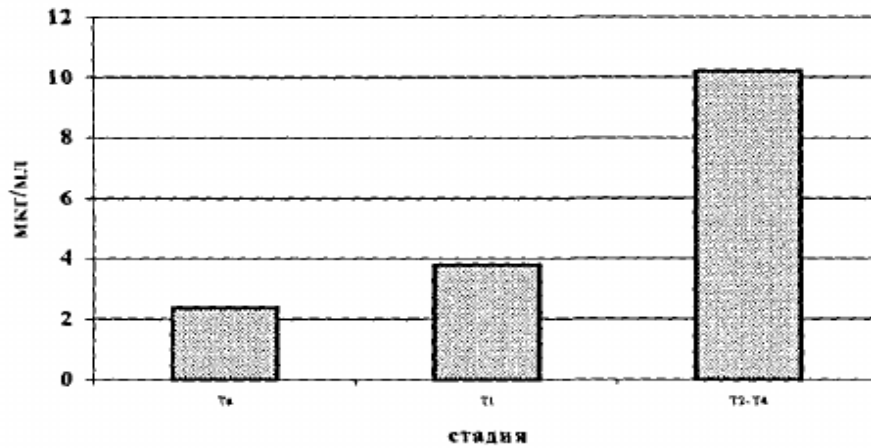
У 16 больных наблюдались первичные опухоли, у 11 - рецидивные.

Определение концентрации уриностагина в моче производилось перед началом проведения противоопухолевого или симптоматического лечения.

Концентрация уриностагина в моче в зависимости от степени инвазии опухоли.

Данные о содержании уриностагина в моче больных РМП в зависимости от степени инвазии опухоли (стадии заболевания) представлены на Рисунке 5.

Концентрация уриностатина в зависимости от степени инвазии опухоли



Средняя концентрация уриностатина составила: в группе больных с неинвазивными опухолями (T₀) - 2,8±1,2 мкг/мл, в группе с поверхностно-инвазивными опухолями (T₁) - 3,8±2,6 мкг/мл, в группе с инвазивными опухолями (T₂, T₃, T₄) - 10,4±7,6 мкг/мл. Из представленных данных видно, что концентрация уриностатина возрастает при увеличении глубины инвазии опухоли. Различие между концентрацией уриностатина у больных с опухолями T₀ и T₁ незначительно, в то же время средний уровень ингибитора трипсина мочи у больных с инвазивными опухолями в 3 раза превышает этот показатель у больных с поверхностными новообразованиями

Динамика концентрации уриностатина в моче больных поверхностным РМП в процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином.

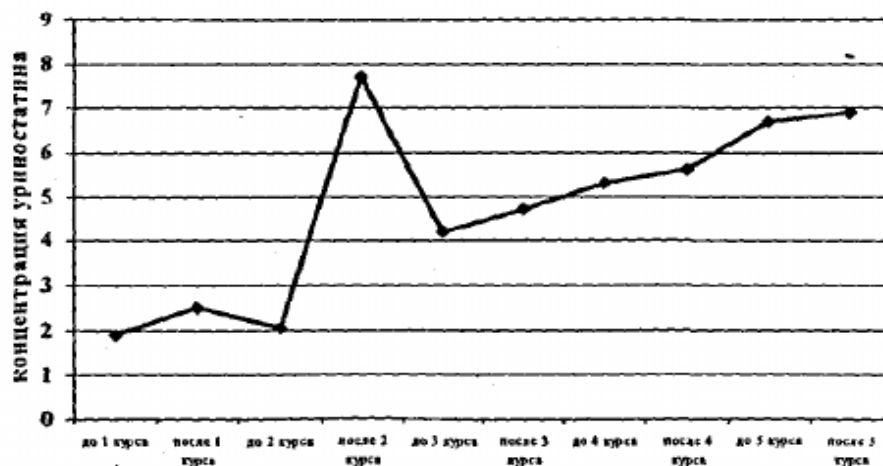
При анализе результатов исследования содержания уриностатина в моче больных, получавших внутрипузырную иммунотерапию Ронколейкином видно, что у всех больных, за исключением больной, у которой отмечено прогрессирование опухолевого процесса, наблюдалось повышение концентрации уриностатина после проведения

первого или второго курса иммунотерапии. Уровень ингибитора, как правило, снижался к началу последующего курса и вновь повышался после проведения лечения. Динамика колебаний средней концентрации уриноостатина в каждой подгруппе (по степени регрессии) в процессе проведения иммунотерапии представлена на рисунках

Средняя концентрация уриноостатина на протяжении всего курса лечения оказалась наибольшей в подгруппе больных, у которых отмечена полная регрессия опухолевого процесса - 8,019 мкг/мл, при этом исходный средний уровень ингибитора до начала лечения у этих пациентов составлял 3,2 мкг/мл. В подгруппе с частичной регрессией средняя концентрация составила 4,706 мкг/мл (исходная концентрация - 1,93 мкг/мл), средний уровень у больного со стабилизацией опухолевого процесса - 4,8 мкг/мл (исходный - 3,1 мкг/мл), у больной с прогрессированием опухоли - 4,325 мкг/мл (3,4 мкг/мл). Таким образом, внутривезикулярное введение ИЛ-2 приводит к повышению концентрации уриноостатина во всех подгруппах больных, но наиболее выраженное повышение наблюдалось у пациентов с полной регрессией опухолей.

В подгруппе больных, у которых достигнута полная регрессия опухолей, связь изменений концентрации уриноостатина с проведением курсов иммунотерапии также прослеживается наиболее определенно. Уровень ингибитора повышался уже после проведения 1 курса и, снижаясь к началу каждого последующего курса, вновь увеличивался после его окончания (за исключением 3 курса иммунотерапии). Несмотря на колебания в процессе проведения курсов иммунотерапии, концентрация уриноостатина оставалась повышенной по отношению к исходной на протяжении всего лечения.

Концентрация уриноостатина в моче больных поверхностным РМП во время проведения внутривезикулярной иммунотерапии ИЛ-2



Несмотря на то, что увеличение уровня ингибитора, исходя из предыдущих данных, должно свидетельствовать о появлении инвазивного роста опухоли, данные наблюдения за больными и полученные результаты позволяют сделать противоположный вывод: повышение концентрации уриностатина в процессе внутрипузырного введения Ронколейкина является благоприятным фактором, позволяющим прогнозировать высокий уровень противоопухолевого эффекта. Можно дать следующее объяснение этому феномену. Инстилляцией ИЛ-2 приводят к повышению продукции различных цитокинов, в том числе ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО, которые по механизму «обратной связи» индуцируют синтез уриностатина. Повышение концентрации ингибитора трипсина мочи, таким образом, связано не с уровнем активности протеолитических ферментов, а с выбросом в кровь цитокиновых молекул. Из этого следует, что уриностагин может принимать участие в механизме противоопухолевого действия ИЛ-2, оказывая торможение на инвазивный потенциал опухоли.

Профилактическая внутрипузырная иммунотерапия поверхностного РМП препаратами рекомбинантного ИФН альфа-2b (Реальдирон и Интрон А).

В исследование по изучению эффективности ИФН-альфа2b при его внутрипузырном применении для профилактики рецидивов поверхностного РМП включено 35 больных. В качестве лекарственной формы ИФН-альфа2 нами использовано 2 препарата: Реальдирон и Интрон А, в связи с чем больные были разделены на 2 группы. Результаты внутрипузырной иммунопрофилактики рассматриваются отдельно в каждой группе и, учитывая одинаковое химическое строение молекул ИФН альфа-2b в обоих препаратах и сходство методик внутрипузырной терапии, в обеих группах вместе.

Характеристика больных.

В группу больных, которым проводилась профилактическая внутрипузырная иммунотерапия препаратом Реальдирон, включено 15 больных поверхностным РМП. Возраст больных колебался от 42 до 75 лет, средний возраст составил 56,6 лет. Мужчин было 9 человек, женщины - 6, соотношение мужчины/женщины - 1,5:1. По степени

инвазии опухоли больные распределились следующим образом: у 4 больных наблюдались опухоли TaNXM0, у 11 больных - T1NXM0. У всех больных диагностирован переходноклеточный рак, у 7 - высокодифференцированный вариант, у 3 - умереннодифференцированный. У 5 пациентов степень дифференцировки не была определена. Первичные опухоли наблюдались у 8 больных, рецидивные - у 7 больных. Перед началом профилактической внутрипузырной иммунотерапии всем больным проведено радикальное хирургическое лечение: ТУР - 11 больным, трансвезикальное удаление опухоли и резекция мочевого пузыря - 4 больным.

В исследовании по изучению эффективности внутрипузырной профилактической иммунотерапии Интроном А включено 20 больных. Возраст больных составлял от 42 до 79 лет, средний возраст - 60,1 года. Мужчин было 14, женщин - 6, соотношение мужчины/женщины - 2,3:1. У всех больных диагностирован рак мочевого пузыря I ст., T1N0M0, гистологически - переходноклеточный рак (у 9 больных - высокодифференцированный, у 9 - умереннодифференцированный, у 2 - низкодифференцированный РМП). У 9 больных наблюдался первично выявленный рак мочевого пузыря, у 11 - рецидивные опухоли: у 2 больных после резекции мочевого пузыря, у 8 - после ТУР, у 1 больной - после ТУР и лучевой терапии. Перед началом внутрипузырной иммунотерапии больным проводилось радикальное хирургическое лечение: 1 больному выполнена резекция мочевого пузыря, 4 - трансвезикальное удаление опухоли, 15 - ТУР мочевого пузыря.

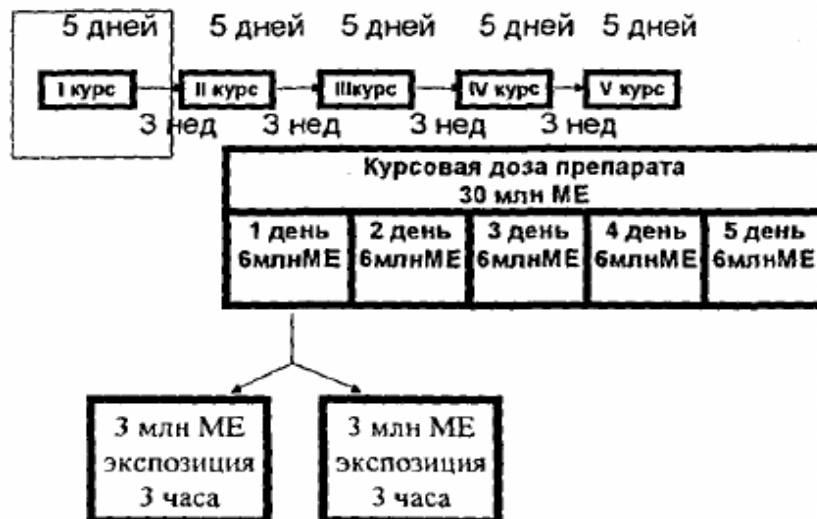
Через каждые 3 месяца с момента операции в течение 1 года наблюдения и далее через каждые 6 месяцев в проводилось контрольное обследование, включающее цистоскопию с биопсией и УЗИ мочевого пузыря. Дополнительное обследование проводилось при появлении клинической симптоматики рецидива РМП.

Всем больным проводилось 5 идентичных курсов внутрипузырной иммунотерапии. Каждый курс продолжался в течение 5 дней подряд. Суточная доза Реальдирина составляла 6 млн МЕ, курсовая доза - 30 млн МЕ, общая доза за весь совокупный курс лечения - 150 млн МЕ. Половина суточной дозы препарата (3 млн МЕ), растворенная ex tempore в 50,0 мл стерильного физиологического раствора, вводилась по катетеру в предварительно опорожненный мочевой пузырь с последующим удержанием

раствора в полости мочевого пузыря в течение 3 часов. Больные регулярно меняли положение тела в течение этого времени, после чего препарат выводился при мочеиспускании. Далее аналогично производилось введение и эвакуация второй половины суточной дозы Реальдирона. Инстиллянии ИФН-альфа2b начинали сразу после купирования дизурических явлений, как правило не позднее чем через 7-14 суток после оперативного вмешательства.

Рис.2

**Методика профилактической внутрипузырной
иммунотерапии препаратом Реальдирон
(интерферон альфа-2b)**



Методика внутрипузырной иммунотерапии Интроном А принципиально была сходной с методикой лечения Реальдироном. Однако учитывая, что при 2 ежедневных катетеризациях в течение 5 дней подряд у ряда больных развивались дизурические явления, продолжительность каждого курса была сокращена, а разовая доза препарата увеличена. Каждому больному проводилось 5 курсов иммунотерапии с интервалом в 3 недели. Длительность каждого курса составляла 3 дня, ежедневно проводилось 2 инстиллянии на 3 часа. Разовая доза препарата составила 6 млн МЕ, суточная доза -

12 млн МЕ, курсовая доза - 36 млн МЕ. Общая доза Интрона А за весь период лечения - 180 млн МЕ.

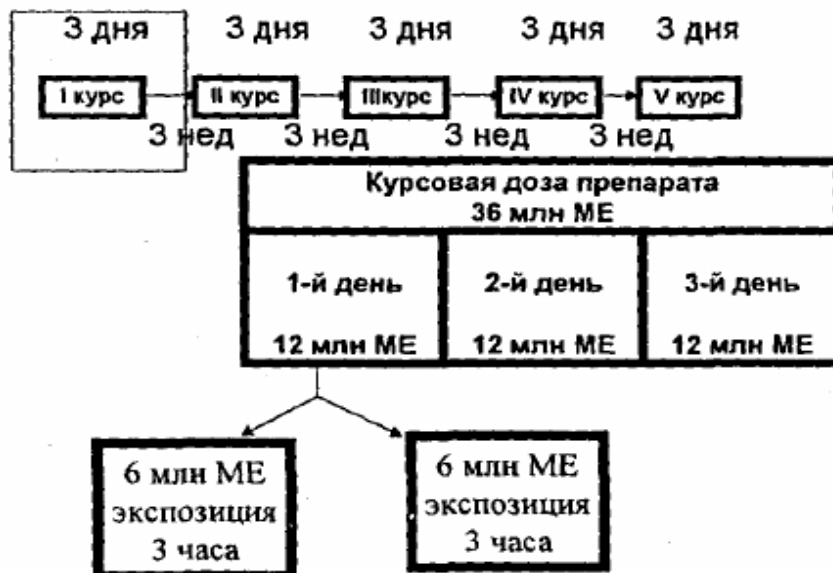
Результаты лечения.

Сроки наблюдения в группе больных, получавших Реальдирон составили от 10 до 47 месяцев, средний срок наблюдения - 28,6 месяца. У 12 больных (80%) отмечается безрецидивное течение, у 3 больных (20%) диагностированы рецидивы заболевания.

Время до появления рецидива составило от 10 до 11 месяцев, среднее время появления рецидива - 10,7 месяца. Частота прогрессирования процесса - 13,3%. Сроки наблюдения за больными, у которых не выявлено рецидивов, составили от 19 до 47 месяцев, среднее время безрецидивного периода - 33,1 месяца.

Сроки наблюдения в группе больных, получавших Интрон А, составили от 7 до

Методика профилактической внутрипузырной иммунотерапии с использованием Интрона А



29 месяцев, средний период наблюдения - 13,8 месяца. У 3 больных (10%) диагности-

рованы рецидивы заболевания у 18 больных (90%) наблюдается безрецидивное течение.

Время до появления рецидива составило от 7 до 11 месяцев, средний период возникновения рецидива - 9 месяцев. Частота прогрессирования процесса - 5%. Сроки наблюдения за больными, у которых не выявлено рецидивов, составили от 7 до 29 месяцев, среднее время безрецидивного периода - 14,3 месяца.

При анализе результатов профилактической внутрипузырной иммунотерапии в обеих группах больных получены следующие результаты. Сроки наблюдения за больными составили от 7 до 47 месяцев, средний срок наблюдения - 20,1 месяца. Рецидивы заболевания диагностированы у 5 из 35 больных (14,3%), безрецидивное течение наблюдается у 30 больных (85,7%). Прогрессирование процесса отмечено у 3 из 5 больных с рецидивами, частота прогрессирования - 8,6%. Период до появления рецидива составлял от 7 до 11 месяцев, среднее время появления рецидива - 10 месяцев. Сроки наблюдения за больными, у которых не выявлено рецидива составляют от 7 до 47 месяцев, среднее время безрецидивного течения - 21,8 месяца.

Токсичность лечения.

Легкие дизурические явления в течение 4-7 дней после курса лечения отмечались у 7 из 15 больных. В анализах мочи наблюдалась умеренная лейкоцитурия. Однако эти явления, по-видимому в большей степени связаны с частыми катетеризациями мочевого пузыря, чем со специфическим побочным действием Реальдирона, так как дизурия проявлялась только к концу курса или после его окончания и наблюдалась только 2-3 раза на протяжении цикла лечения. Только у 1 больной наблюдалась выраженное осложнение, проявившееся в виде местных и системных токсических реакций (гипертермия до 39,0°C с ознобом, выраженная дизурия и поллакиурия, при цистоскопии - картина диффузного катарального цистита с резким усилением сосудистого рисунка и везикулярными высыпаниями по всей слизистой мочевого пузыря, эозинофилия в анализе крови). Данные проявления были расценены нами как токсико-аллергическая реакция на внутрипузырное введение Реальдирона. Больной проведено

лечение антибактериальными, десенсибилизирующими, противовоспалительными препаратами, лихорадка была купирована на следующий день, дизурические явления - через 4 дня. У остальных больных не наблюдалось никаких системных побочных реакций и осложнений.

Во время проведения и по окончании курсов внутривезикулярной профилактической иммунотерапии Интроном А нами не отмечено никаких специфических побочных реакций и осложнений. Легкие дизурические явления, отмечавшиеся у некоторых больных, были связаны с погрешностями при катетеризации и легко купировались в течение 1-2 дней. В клинических и биохимических анализах крови не отмечено каких-либо существенных сдвигов, что свидетельствует об отсутствии системной токсичности Интрона А.

Результаты наблюдения за больными контрольной группы.

В контрольную группу включено 20 больных, из них 15 мужчин, 5 женщин, соотношение мужчины/женщины - 3:1. Возраст больных составлял от 35 до 70 лет, средний возраст - 55,7 лет. У всех больных наблюдался переходноклеточный рак, у 7 - высокодифференцированный вариант, у 5 - умереннодифференцированный, у 3 - низкодифференцированный РМП, у 5 больных степень дифференцировки не была определена. По степени инвазии опухоли у 4 больных определялся РМП T_aN_XM₀, у 16 - T₁N_XM₀. У 12 больных перед операцией были выявлены первичные опухоли, у 8 - рецидивные после различных вариантов лечения. 11 больным произведена ТУР мочевого пузыря, 8 - резекция и трансвезикальное удаление опухоли. Динамическое наблюдение проводилось в те же сроки, как и в группах с внутривезикулярной профилактической иммунотерапией ИФН альфа-2b.

Сроки наблюдения за больными составили от 3 до 28 месяцев, средний срок наблюдения - 13,2 месяца. Безрецидивное течение наблюдается у 9 больных (45%), рецидивы диагностированы у 11 больных (55%). Прогрессирование процесса отмечено у 6 больных (30%). Время до появления рецидива составило от 3 до 12 месяцев, средний период появления рецидива - 7,3 месяца. Сроки наблюдения за больными, у которых

наблюдается безрецидивное течение составили от 9 до 28 месяцев, средний срок 18,4 месяца.

Результаты наблюдения за больными, которым проводилась внутрипузырная иммунотерапия ИФН альфа 2b, и за больными контрольной группы представлена в таблице.

Таблица

Результаты профилактической внутрипузырной иммунотерапии ИФН альфа 2b в сравнении с контрольной группой.

Препарат	Число больных	Средний срок наблюдения (мес)	Рецидивы (абс/%)
Реальдирон	15	28,6	3(20%)
Интрон А	20	13,8	2(10%)
Реальдирон + Интрон А	35	20,1	5 (14,3%)
Контрольная группа	20	18,4	11(55%)

Различия между показателями частоты возникновения рецидивов в группе больных, получавших внутрипузырную иммунотерапию, и в контрольной группе статистически достоверны.

В литературе широко обсуждается вопрос о зависимости эффективности внутрипузырной интерферонотерапии от дозы препарата. В исследовании Glashan и соавт. (1993) прослеживается четкий дозозависимый эффект ИФН альфа 2b при лечении *carcinoma in situ* (43% полных регрессий при дозе 100 млн МЕ и 5% - при дозе 10 млн МЕ). В связи с этим большинство авторов традиционно применяют большие дозы препарата и при профилактическом применении. Однако в работах Kostakopoulos и соавт. (1990) и Engelmann и соавт. (1992) неплохие результаты адьювантной внутрипузырной иммунотерапии достигнуты при использовании 10 млн МЕ ИФН альфа 2b (рецидивы развились соответственно в 36,7 и 18% случаев). Hoeltl (1992) при проведении профилактических инстилляций ИФН альфа 2b в дозах 10 и 100 млн МЕ получил одинаковые результаты. Поэтому при определении режима и дозы внутрипузырной иммунотерапии препаратами Реальдирон и Интрон А мы пошли по пути применения небольших доз препаратов в сочетании с длительным контактом ИФН альфа 2b со

слизистой мочевого пузыря. Различия в методиках введения этих двух препаратов объясняются лишь тем, что частые катетеризации мочевого пузыря приводят к развитию у части больных легких дизурических явлений. В связи с этим количество катетеризаций в течение 1 курса было уменьшено с 10 (Реальдирон) до 6 (Интрон А). Сроки наблюдения в течение 20 месяцев в опытных группах позволяют сделать вывод об эффективности профилактических инстилляций ИФН альфа 2b. По-видимому, при профилактическом применении дозозависимый эффект ИФН альфа 2b не выражен так, как при лечении РМП, и предпочтение следует отдавать не повышению дозы препарата, а удлинению времени контакта препарата со слизистой мочевого пузыря и увеличению продолжительности всего курса лечения, что позволяет при сохранении эффективности лечения избежать токсических проявлений.

ВЫВОДЫ.

1. Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного РМП с применением рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкина) является эффективным методом лечения. Уровень объективного противоопухолевого эффекта препарата (полные и частичные регрессии) составил 85,7%. Применение Ронколейкина в режиме внутрипузырного введения характеризуется полным отсутствием местных и системных побочных эффектов. Лечение более эффективно у больных, не получавших ранее специфической противоопухолевой терапии и у больных с высокодифференцированным РМП.
2. В процессе проведения внутрипузырной иммунотерапии Ронколейкином после окончания каждого курса лечения наблюдается повышение содержания субпопуляции CD25-позитивных лимфоцитов в периферической крови, что свидетельствует о системной активации иммунитета.
3. Концентрация уриностатина в моче больных поверхностным РМП, получающих внутрипузырную иммунотерапию с использованием Ронколейкина, увеличивается после окончания курса лечения и снижается к началу проведения последующего курса, данные изменения более выражены в группах больных с полной и частичной регрессией опухолевого процесса. Средняя

концентрация уриностаина во время лечения повышается по сравнению с исходной, особенно в группе больных, у которых диагностирована полная регрессия опухоли (соответственно 3,2 и 8,02 мкг/мл). Увеличение концентрации уриностаина в моче является благоприятным прогностическим фактором для определения эффективности внутрипузырной иммунотерапии ИЛ-2.

4. Внутрипузырная иммунотерапия с применением препаратов рекомбинантного ИФН альфа-2b (Реальдирон и Интрон А) является эффективным методом профилактики рецидивов поверхностного РМП и позволяет снизить частоту рецидивирования до 14,3 %, а прогрессирования - до 8,6% (средний период наблюдения - 20,1 месяца) по сравнению с контрольной группой (частота возникновения рецидивов - 55%, частота прогрессирования процесса - 30%, средний период наблюдения - 18,4 месяца). Проявления токсичности отмечены только в 1 случае (2,9%) (Реальдирон).

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного рака мочевого пузыря препаратом интерлейкина-2. – В кн. «Актуальные вопросы комбинированного и комплексного лечения злокачественных опухолей» (Материалы XXXI конференции молодых ученых МНИОИ им. П. А. Герцена, 22 декабря 1995 г., Москва, стр. 13) (в соавт.).
2. Внутрипузырная иммунотерапия рака мочевого пузыря препаратом рекомбинантного интерлейкина-2. - В кн. «Актуальные вопросы онкологии» (Материалы международного симпозиума, Санкт-Петербург, 1996, стр. 145-146) (в соавт.).
3. Ультразвуковая и флюоресцентная диагностика на этапах лечения рака мочевого пузыря. – В кн. «Актуальные вопросы онкологии» (Материалы международного симпозиума, Санкт-Петербург, 1996, стр. 126-127) (в соавт.).

4. Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного рака мочевого пузыря препаратом рекомбинантного интерлейкина-2. – В кн. «I съезд онкологов стран СНГ. Москва, 3-6 декабря 1996» (Материалы съезда, часть 2, стр. 420) (в соавт.).
5. The Intravesical IL-2-Immunotherapy of Superficial Bladder Carcinoma. – 7th International Congress on Anticancer Treatment (February 1997, Paris, p. 179) (в соавт.).
6. Intravesical IL-2-immunotherapy of superficial Bladder Cancer. – First International Meeting On Advanced in the Knowledge of Cancer Management (June 28 to July 1, 1997, Vienna, Austria) (в соавт.).
7. Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного рака мочевого пузыря с использованием рекомбинантного интерлейкина-2. – В кн. «Актуальные вопросы лечения онкоурологических заболеваний» (Материалы 2 Всероссийской научной конференции с участием стран СНГ 20-21 ноября 1997 г., Обнинск, 1997, стр. 63-64) (в соавт.).
8. Внутрипузырная иммунотерапия поверхностного рака мочевого пузыря препаратом рекомбинантного интерлейкина-2. – Российский Онкологический Журнал,